

**UNIVERZITA KARLOVA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

STUDIJNÍ PROGRAM: BIOCHEMIE



VÍTĚZSLAV BRINSA

**REGULACE METABOLISMU PURINOVÝCH NUKLEOTIDŮ JAKO
FARMAKOLOGICKÝ CÍL**

**REGULATION OF PURINE NUCLEOTIDE METABOLISM AS
A PHARMACOLOGICAL TARGET**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vedoucí práce: RNDr. Pavlína Maloy Řezáčová, Ph.D.

Konzultant: Ing. Aleš Hnízda, Ph.D.

PRAHA 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci ani její podstatnou část nepředložil k získání jiného nebo stejného akademického titulu, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením své školitelky RNDr. Pavlíny Maloy Řezáčové, Ph.D. a konzultanta Ing. Aleše Hnízdy, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne

.....
Vítězslav Brinsa

Tato práce byla vypracována v Laboratoři strukturní biologie na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i. Financována byla projektem GA15-06582S Grantové agentury České republiky.

Poděkování

Rád bych na tomto místě poděkoval své školitelce RNDr. Pavlíně Maloy Řezáčové, Ph.D. za trpělivost a vlídný přístup, cenné rady, odborné vedení a též zaštitění bakalářské práce. Můj velký dík patří především Ing. Aleši Hnízdovi, Ph.D. za jeho velkou trpělivost a vstřícnost, nespočetné množství cenných rad, připomínek a doporučení a velice ochotnou pomoc při jakémkoliv problému při práci v laboratoři i psaní práce. Dále bych chtěl poděkovat RNDr. Milanovi Fábrymu, CSc. za přípravu expresních plasmidů, Ing. Ireně Sieglkové za jazykovou korekturu a společně s Ing. Marcelou Mádlíkovou za pomoc a laskavé rady při práci v laboratoři a celému kolektivu laboratoře za podporu a vytvoření skvělé a přátelské atmosféry na pracovišti. V neposlední řadě bych velice rád poděkoval své rodině, přátelům a blízkým za velkou pomoc a podporu během psaní této práce i celého studia.

Abstrakt

Purinové nukleotidy tvoří základní stavební kameny DNA a RNA. Jsou nepostradatelnou součástí struktury některých kofaktorů, podílejí se na přenosu a skladování energie, buněčné signalizaci a regulaci biochemických procesů v buňce. Pro správnou funkci, přežití a dělení buněk je naprosto nezbytné, aby měly neustále dostatečnou zásobu nukleotidů.

Hladina purinových nukleotidů je v lidském těle regulována prostřednictvím jejich metabolismu, jenž sestává ze tří koordinovaných procesů. Těmi jsou *de novo* syntéza, resyntéza a degradace. Regulace těchto procesů je řízena na různých buněčných úrovních od regulace genové exprese zapojených enzymů, jejich allosterické regulace až po utváření multienzymových komplexů v *de novo* syntéze – tzv. purinosomů.

Důležitou složkou metabolismu purinových nukleotidů jsou fosforibosylpyrofosfát synthetasa I (PRS-I) a cytosolická purinová 5'-nukleotidasa (cN-II). Tyto enzymy se významně podílejí na regulaci hladiny purinů prostřednictvím jejich allostericky regulované aktivity. Poruchy aktivity těchto enzymů jsou spojeny různými onemocněními včetně dny, tvorby ledvinových kamenů, neurologických dysfunkcí či akutní lymfoblastické leukemie (ALL).

Mutantní varianta cN-II nesoucí mutaci R238W způsobuje relaps ALL. Cílem experimentální části této práce byla příprava a krystalizace neaktivní mutantní formy cN-II D52N+R238W (D52N je inaktivující mutace). Rekombinantní expresí v hostitelských buňkách bakteriálního kmene *Escherichia coli* BL 21 (DE3) RIL a následnou purifikací rekombinantního produktu z bakteriálního lyzátu se podařilo získat dostatečné množství čistého proteinu pro krystalizaci. Krystalizace byla provedena podle zavedených postupů pro cN-II a podařilo se získat proteinový krystal vhodný pro sběr difrakčních dat pro následnou strukturní analýzu metodou rentgenové difrakce.

Klíčová slova: metabolismus purinových nukleotidů, allosterická regulace, strukturní biologie

Abstract

Purine nucleotides are essential basic building blocks for DNA and RNA synthesis. They can also serve as energy storage and transfer unit and play an important role in cell signalling and regulation of variety of biochemical processes. It is crucial for the cells to maintain a sufficient supply of purine nucleotides in order to secure its survival and cell division.

Level of purine nucleotide pool in the human body is regulated via purine nucleotide metabolism, which consists of three coordinated processes: *de novo* synthesis pathway, salvage pathway and degradation pathway of purine nucleotides. Regulation of those three pathways is under control of various mechanisms including regulation on the level of enzyme expression, allosteric regulation of enzyme activity or forming a multienzyme complexes, i. e. purinosomes in the *de novo* synthesis pathway.

Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase I (PRS-I) and cytosolic purine 5'-nucleotidase (cN-II) play an important role in purine nucleotide metabolism. These enzymes contribute significantly to the purine nucleotide pool regulation by means of their allosterically regulated activity. Malfunctions of their catalytic activity are connected with various pathologies such as gout, hyperuricosuria, neurological dysfunctions and acute lymphoblastic leukaemia (ALL).

A cN-II variant carrying R238W activating mutation leads to ALL relapse. The aim of the experimental part of this work was a preparation and crystallization of inactive mutant cN-II D52N+R238W variant (D52N has an inactivating effect on cN-II catalytic activity). By heterologous expression in *Escherichia coli* BL 21 (DE3) RIL bacteria and consequent two-step purification of the bacterial lysate, a sufficient amount of pure protein was obtained to perform crystallization experiments. Following well-established protocol for cN-II crystallization, the protein crystallization yielded protein crystal with sufficient qualities to perform diffraction experiments for subsequent structural analysis by X-ray crystallography.

Keywords: purine nucleotide metabolism, allosteric regulation, structural biology

Seznam zkratek

<u>ZKRATKA</u>	<u>VÝZNAM ANGLICKY</u>	<u>VÝZNAM ČESKY</u>
2,3-BPG	2,3-bisphosphoglycerate	2,3-bisfosfoglycerát
5'N	5'-nucleotidases	5'-nukleotidasy
6-MP	6-mercaptopurine	6-merkaptopurin
6-TG	6-thioguanine	6-thioguanin
AA	acrylamide	akrylamid
ADA	adenosine deaminase	adenosin deaminasa
ADK	adenosine kinase	adenosin kinasa
ADP	adenosine diphosphate	adenosin difosfát
ADSL	adenylosuccinate lyase	adenylosukcinát lyasa
ADSS	adenylosuccinate synthase	adenylosukcinát synthasa
AICAR	aminoimidazole-carboxamide ribonucleotide	5-aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotid
AICARTfáse	5-aminoimidazole-4-carboxamid ribonucleotide transformylase	5-aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotid transformylasa
AIR	5-aminoimidazole ribonucleotide	5-aminoimidazol ribonukleotid
AIRS	5-aminoimidazole ribonucleotide synthetase	fosforibosyl aminoimidazol synthetasa
AK	adenylate kinase	adenylát kinasa
ALL	acute lymphoblastic leukaemia	akutní lymfoblastická leukemie
AMP	adenosine monophosphate	adenosin monofosfát
AMPDA	adenosine monophosphate deaminase	adenosin monofosfát deaminasa
AMPS	adenylosuccinate	adenylosukcinát
Ap4A	diadenosine tetraphosphate	diadenosin tetrafosfát
APRT	adenine phosphoribosyltransferase	adenosin fosforibosyltransferasa
ApxA	diadenosine polyphosphate	diadenosin polyfosfát
ATP	adenosine triphosphate	adenosin trifosfát
BIS	N,N'-methylene-bis(acrylamide)	N,N'-methylen-bis(akrylamid)
CAIR	carboxyaminoimidazole phosphoribosyl ribonucleotide	karboxyaminoimidazol ribonukleotid
CAIRS	carboxyaminoimidazole phosphoribosyl synthetase	karboxyaminoimidazol ribonukleotid synthetasa
cdN	cytosolic 5'(3')-nucleotidase	cytosolická 5'(3')-nukleotidasa
CMTX	Charcot-Marie-Tooth disease, X-linked	dědičná choroba Charcot-Marie- Tooth
cN-IA	cytosolic 5'-nucleotidase IA	cytosolická 5'-nukleotidasa IA
cN-IB	cytosolic 5'-nucleotidase IB	cytosolická 5'-nukleotidasa IB
cN-II	cytosolic 5'-nucleotidase II	cytosolická 5'-nukleotidasa II
cN-III	cytosolic 5'-nucleotidase III	cytosolická 5'-nukleotidasa III
CoA	Coenzyme A	Koenzym A
CTP	cytosine triphosphate	cytosin trifosfát
dATP	deoxyadenosine triphosphate	deoxyadenosin trifosfát

DFNX	non-syndromic hearing loss, X-linked	dědičná percepční nedoslýchavost
dGMP	deoxyguanosine monophosphate	deoxyguanosin monofosfát
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleotidová kyselina
DTT	dithiothreitol	dithiothreitol
mdN	mitochondrial 5'(3')-nucleotidase	mitochondriální 5'(3')-nukleotidasa
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	ethylendiamintetraoctová kyselina
FAD	flavin adenine dinucleotide	flavinadenindinukleotid
FAICAR	N-formylaminoimidazole-4- carboxamide ribonucleotide	N-formylaminoimidazol-4- karboxamid ribonukleotid
FGAM	N-formylglycinamidine ribonucleotide	N-formylglycinamidin ribonukleotid
FGAMS	phosphoribosyl formylglycinamidine synthase	fosforibosyl formylglycinamidin synhtasa
FGAR	N-formylglycinamide ribonucleotide	N-formylglycinamid ribonukleotid
fosfo-(cN-II)	phospho-(cytosolic 5'- nucleotidase-II) intermediate	fosfo-(cytosolická 5'-nukleotidasa- II) intermediát
FPLC	fast protein liquid chromatography	proteinová kapalinová chromatografie
GAR	glycinamide ribonucleotide	glycinamid ribonukleotid
GARS	phosphoribosylglycinamide synthetase	fosforibosylglycinamid synthetasa
GARTfase	glycinamide ribonucleotide formyltransferase	fosforibosyl glycinamid formyltransferasa
GDA	guanine deaminase	guanin deaminasa
GDP	guanosine diphosphate	guanosin difosfát
GK	guanylate kinase	guanylát kinasa
GMP	guanosine monophosphate	guanosin monofosfát
GMPS	guanosine monophosphate synthetase	guanosin monofosfát synthetasa
GTP	guanosine triphosphate	guanosin trifosfát
HAD	haloacid dehalogenase	haloacidní dehalogenasa
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1- piperazineethanesulfonic acid	4-(2-hydroxyethyl)-1- piperazinethansulfonová kyselina
HGPRT	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	hypoxanthin-guanin fosforibosyltransferasa
h/rPAP	human or rat phosphoribosyl pyrophosphate synthetase- associated protein	lidský nebo krysí fosforibosylpyrofosfát synthetasa sdružený protein
IGK	inosine-guanosine kinase	inosin-guanosin kinasa
IMP	inosine monophosphate	inosin monofosfát
IMPDH	inosine monophosphate dehydrogenase	inosin monofosfát dehydrogenasa
IMPCH	inosine monophosphate cyclohydrolase	inosin monofosfát cyklohydrolasa
IPTG	isopropyl β-D-1- thiogalactopyranoside	isopropyl β-D-1- thiogalaktopyranosid

LB	Luria-Bertani	Luria-Bertani
miRNA	micro ribonucleic acid	mikro ribonukleotidová kyselina
mRNA	messenger ribonucleic acid	messengerová ribonukleotidová kyselina
meTGMP	methyl-thioguanine monophosphate	methyl-thioguanin monofosfát
MTHFD2	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2	methylenetetrafolát dehydrogenasa 2
meTIMP	methyl-thioinosine monophosphate	methyl-thioinosin monofosfát
mTOR	mechanistic target of rapamycin	mechanistický cíl rapamycinu
MW	molecular weight	molekulová hmotnost
NAD ⁺	nicotinamide adenine dinucleotide	nikotinamidadenindinukleotid
NADP ⁺	nicotinamide adenine dinucleotidephosphate	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NDK	nucleoside diphosphate kinase	nukleosid difosfát kinasa
OD ₆₀₀	optical density in 600 nm wavelength	optická densita při vlnové délce 600 nm
PBS	phosphate buffered saline	fosfátový pufr
PNP	phosphonucleoside phosphorylase	purin nukleosid fosforylase
PPAT	phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase	fosforibosylpyrofosfát amidotransferasa
PP _i	pyrophosphate ion	pyrofosfátový iont
PRA	phosphoribosylamine	fosforibosylamin
PRPP	phosphoribosyl pyrophosphate	fosforibosylpyrofosfát
PRS	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase	fosforibosylpyrofosfát synthetasa
PRS-I	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase I	fosforibosylpyrofosfát synthetasa I
PRS-II	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase II	fosforibosylpyrofosfát synthetasa II
PRS-III	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase III	fosforibosylpyrofosfát synthetasa III
R5P	ribose-5-phosphate	ribosa-5-fosfát
RCF	relative centrifugal force	relativní centrifugační síla
RNA	ribonucleic acid	ribonukleotidová kyselina
RPM	revolutions per minute	otáčky za minutu
SAICAR	phosphoribosyl aminoimidazole succinocarboxamide	N-sukcinyl-5-aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotid
SAICARS	phosphoribosyl aminoimidazole succinocarboxamide synthetase	N-sukcinyl-5-aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotid synthetasa
SCID	severe combined immunodeficiency disease	těžká kombinovaná primární imunodeficience
SDS	sodium dodecyl sulphate	dodecylsíran sodný
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
S ₂ N	nucleophilic substitution	nukleofilní substituce
TB	Terrific Broth	Terrific Broth

TCEP	tris(2-carboxyethyl)fosfan	tris(2-karboxyethyl)fosfan
TEMED	N,N,N',N'- tetramethylethylenediamine	N,N,N',N'- tetramethylethylenediamin
TGMP	6-thioguanosine monophosphate	6-thioguanosin monofosfát
THF	tetrahydrofolate	tetrahydrofolát
TIMP	6-thioinosine monophosphate	6-thioinosin monofosfát
TPMT	thiopurine methyltransferase	thiopurin methyltransferasa
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UTP	uridine triphosphate	uridin trifosfát
VP-S	reducing sample-buffer	redukující vzorkový pufr
XDH	xanthine dehydrogenase	xanthin dehydrogenasa
XMP	xanthine monophosphate	xanthin monofosfát
XO	xanthine oxidase	xanthin oxidasa
XOR	xanthine oxidoreductase	xanthin oxidoreduktasa

Obsah

1	Úvod.....	12
2	Přehled současného stavu problematiky	13
2.1	Purinové nukleotidy	13
2.2	Metabolismus purinových nukleotidů.....	13
2.2.1	Degradace purinových nukleotidů	14
2.2.2	Resyntéza purinových nukleotidů.....	15
2.2.3	De novo syntéza purinových nukleotidů	15
2.3	Regulace metabolismu purinových nukleotidů.....	18
2.3.1	Regulace degradace purinových nukleotidů	18
2.3.2	Regulace resyntézy purinových nukleotidů	19
2.3.3	Regulace de novo syntézy purinových nukleotidů	20
2.3.4	Purinosom	21
2.4	Fosforibosylpyrofosfát syntetasy (PRS)	24
2.5	Fosforibosylpyrofosfát syntetasa I (PRS-I).....	26
2.5.1	Struktura PRS-I.....	27
2.5.2	Aktivní místo PRS-I.....	29
2.5.3	Allosterická místa	30
2.5.4	Regulace aktivity PRS-I.....	32
2.5.5	Mutace PRS-I a s nimi spojené poruchy.....	33
2.6	Cytosolická purinová 5'-nukleotidasa II (cN-II)	37
2.6.1	Katalytická aktivita cN-II	38
2.6.2	Struktura cN-II.....	39
2.6.3	Allosterická regulace aktivity a její poruchy	40
2.7	Akutní lymfoblastická leukemie	42
2.7.1	Mechanismus relapsu způsobený mutacemi cN-II	43
2.7.2	Mechanismus relapsu způsobený mutacemi PRS-I.....	43

3	Cíl práce	45
4	Materiál a metody	46
4.1	Materiál	46
4.1.1	Bakteriální kmeny	46
4.1.2	Plasmidy.....	46
4.1.3	Chemikálie	46
4.1.4	Roztoky a média	47
4.1.5	Chromatografické kolony	49
4.1.6	Ostatní materiál.....	49
4.1.7	Přístroje a vybavení	50
4.2	Metody	51
4.2.1	Rekombinantní exprese proteinu	51
4.2.2	Purifikace proteinu.....	52
4.2.3	Chelatační chromatografie.....	52
4.2.4	Iontově výměnná chromatografie	53
4.2.5	Dialýza	53
4.2.6	Zahuštění.....	53
4.2.7	Stanovení koncentrace proteinu měřením absorbance.....	54
4.2.8	Diskont. elektroforesa v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS	54
4.2.9	Krystalizace metodou difuzí par	55
5	Výsledky	56
5.1	Heterologní exprese rekombinantního proteinu	56
5.2	Purifikace rekombinantního proteinu.....	57
5.3	Příprava proteinových krystalů pro difrakční analýzu	60
6	Diskuse.....	62
7	Závěr	63
8	Seznam použité literatury	64

1 Úvod

Metabolismus purinových nukleotidů je již mnoho let studovanou oblastí biochemie a molekulární biologie. Za tuto dobu byly získány cenné vědomosti o jeho funkčních složkách, mechanismu fungování a regulaci. Zejména v průběhu několika posledních desetiletí se čím dál více ukazuje význam této metabolické dráhy pro pochopení patologických stavů organismu, neboť jsou mnohdy zapříčiněny změnami v této dráze [1].

Purinový metabolismus je složen ze tří synchronizovaných procesů: *de novo* syntézy, resyntézy a degradace purinových nukleotidů, pomocí nichž buňky hospodaří s purinovými nukleotidy. Fungování těchto tří procesů je regulováno různými způsoby, mezi něž patří allosterická regulace zapojených enzymů, regulace jejich exprese na úrovni transkripce či dokonce formování nadproteinových komplexů. Poměrně novým objevem v této oblasti je právě formování multienzymových komplexů v *de novo* syntéze, jejichž účelem je zvýšení rychlosti dráhy, usnadnění přísunu substrátů a ochrana meziproductů před okolním prostředím cytoplazmy [2].

Důležitou roli v lidském metabolismu purinových nukleotidů mají enzymy fosforibosylpyrofosfát syntetasa I (PRS-I) a cytosolická 5'-nukleotidasa II (cN-II). Tyto enzymy se významně podílí na regulaci purinového metabolismu. Poruchy jejich aktivity způsobené nejen mutacemi v genech, které je kódují, vedou k mnohým a často závažným onemocněním. Jedním z těchto onemocnění je relaps akutní lymfoblastické leukemie (ALL), který je mj. zapříčiněn právě některými mutacemi PRS-I a cN-II [3, 4].

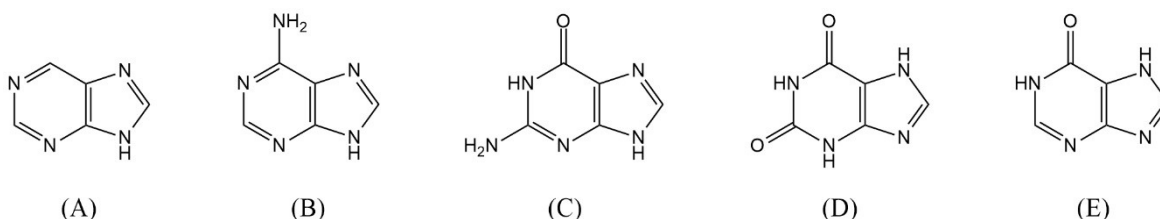
Z těchto a mnohých dalších důvodů je metabolismus purinových nukleotidů velice významným farmakologickým cílem a jeho další výzkum je klíčový pro navržení efektivních terapeutických strategií.

2 Přehled současného stavu problematiky

2.1 Purinové nukleotidy

Purinové nukleotidy (*Obrázek 1*) představují jeden ze dvou druhů základních stavebních kamenů pro výstavbu molekul DNA a RNA. Jsou také součástí některých kofaktorů (NADH, NADPH, koenzym a atd.), podílejí se na přenosu a skladování energie (ATP a GTP), buněčné signalizaci (cyklické AMP a GMP) a regulaci biochemických procesů v buňce [5]. Pro správnou funkci, přežití a dělení buněk je tedy naprosto nezbytná dostatečná zásoba nukleotidů.

Tato práce je zaměřena na metabolismus purinových nukleotidů a jeho regulaci. Poruchy regulace jsou často úzce spjaty se zdravotními problémy a závažnými onemocněními – např. hyperurikémie, hyperurikosurie, dna, Lesch-Nyhanův syndrom, těžká kombinovaná primární imunodeficience (SCID, *angl.* severe combined immunodeficiency disease), mentální retardace či akutní lymfoblastická leukemie (ALL) [1].



Obrázek 1 – Purinové báze (zkráceně puriny) tvoří součást purinových nukleotidů a jsou odvozeny od struktury purinu:

(A) purin; (B) adenin; (C) guanin; (D) xanthin; (E) hypoxanthin. Obrázek chemických struktur byl vytvořen v programu ChemBioDraw Ultra12.0.2 (© 1986 - 2010 CambridgeSoft.).

2.2 Metabolismus purinových nukleotidů

Hladina purinových nukleotidů v buňkách je primárně udržována a regulována prostřednictvím tří koordinovaných procesů: *de novo* syntézy, degradace a resyntézy purinových nukleotidů. Při *de novo* syntéze dochází k výstavbě nových molekul purinových nukleotidů ze základních metabolitů, degradační cestou jsou pak rozkládány na jednodušší a pro některé organismy zároveň odpadní látky. Resyntéza nebo v doslovném překladu "záchranná dráha" (*angl.* salvage pathway) se uplatňuje při recyklaci purinových bází zpět na purinové nukleotidy. Tyto báze vznikají v průběhu degradace purinových nukleotidů a kromě toho jsou také do buňky transportovány z extracelulárního prostoru [6]. Za klidových fyziologických podmínek je hladina

purinových nukleotidů v buňce udržována převážně degradací a resyntézou, neboť *de novo* syntéza je oproti resyntéze energeticky mnohem náročnější (viz 2.2.3 *De novo* syntéza purinových nukleotidů) [2, 7]. Je-li však spotřeba purinových nukleotidů vyšší (například při buněčném růstu nebo dělení), je do jejich produkce zapojena také *de novo* syntéza. Udržování stálé hladiny purinových nukleotidů jmenovanými procesy je tedy naprosto klíčové pro správnou buněčnou funkci [5, 7, 8].

2.2.1 Degradace purinových nukleotidů

Purinové nukleotidy jsou degradovány ve sledu několika reakčních kroků, jejichž počet a konečné produkty se liší v závislosti na druhu organismu. Způsob využití degradační dráhy závisí na tom, zdali se jedná o živočichy, rostliny či mikroorganismy. Zatímco rostlinám slouží degradační dráha především za účelem translokace a skladování dusíku, živočichové tuto dráhu využívají k odbourání purinového dusíku v podobě dusíkatých odpadních látek. Tyto odpadní látky, které živočichové vylučují, jsou poté recyklovány mikroorganismy [9]; také mikroorganismy však využívají degradační dráhu [10].

Degradace purinových nukleotidů (Obrázek 2, str. 16) začíná jejich defosforylací. Tento úvodní krok degradační dráhy je katalyzován specifickými 5'-nukleotidasami (5'N; EC 4.1.3.5) a nespecifickými fosfatasami v hydrolytické reakci za vzniku příslušných nukleosidů. Guanosin monofosfát (GMP) je defosforylován na guanosin, inosin monofosfát (IMP) na inosin, adenosin monofosfát (AMP) na adenosin. Aby mohlo dojít k degradaci AMP či adenosinu, musí být deaminační reakcí přeměněn na IMP, resp. inosin. Ireversibilní přeměnu AMP zajišťuje enzym AMP deaminasa (AMPDA; EC 3.5.4.6), tutéž přeměnu adenosinu pak enzym adenosin deaminasa (ADA; EC 3.5.4.4). Nukleosidy vzniklé defosforylací (inosin, guanosin, xanthosin a jejich deoxynukleosidové deriváty) jsou následně katalytickou aktivitou enzymu purin nukleosid fosforylasy (PNP; EC 2.4.2.1) rozštěpeny na příslušné purinové báze a (deoxy)ribosa-1-fosfát. Z xanthosinu tak vzniká xanthin, z inosinu hypoxanthin a z guanosinu guanin, který je na xanthin přeměněn deaminací působením guanin deaminasy (GDA; EC 3.5.4.3). Hypoxanthin a xanthin jsou substráty pro enzym xanthin oxidoreduktasu (XOR), která je schopna oxidovat hypoxanthin na xanthin a ten poté na kyselinu močovou. Kyselina močová se fyziologicky vyskytuje převážně v podobě své soli – urátu [10-13].

Urát je konečným produktem degradační dráhy některých vyšších živočichů včetně lidí a primátů. Ostatní živočichové mají schopnost jej dále odbourávat postupně přes allantoin, kyselinu allantoovou a ureidoglykolát až na močovinu, která může být ještě rozložena na amoniak a oxid uhličitý. [14]. V závislosti na konečném produktu degradace purinových nukleotidů lze proto živočichy rozdělit na urikotelní, ureotelní a amonotelní. Urikotelní živočichové vylučují purinový dusík ve formě urátu (člověk, primáti, ptáci, plazi, hmyz), ureotelní pak ve formě močoviny (savci) a amonotelní ve formě amonných iontů (vodní živočichové) [10]

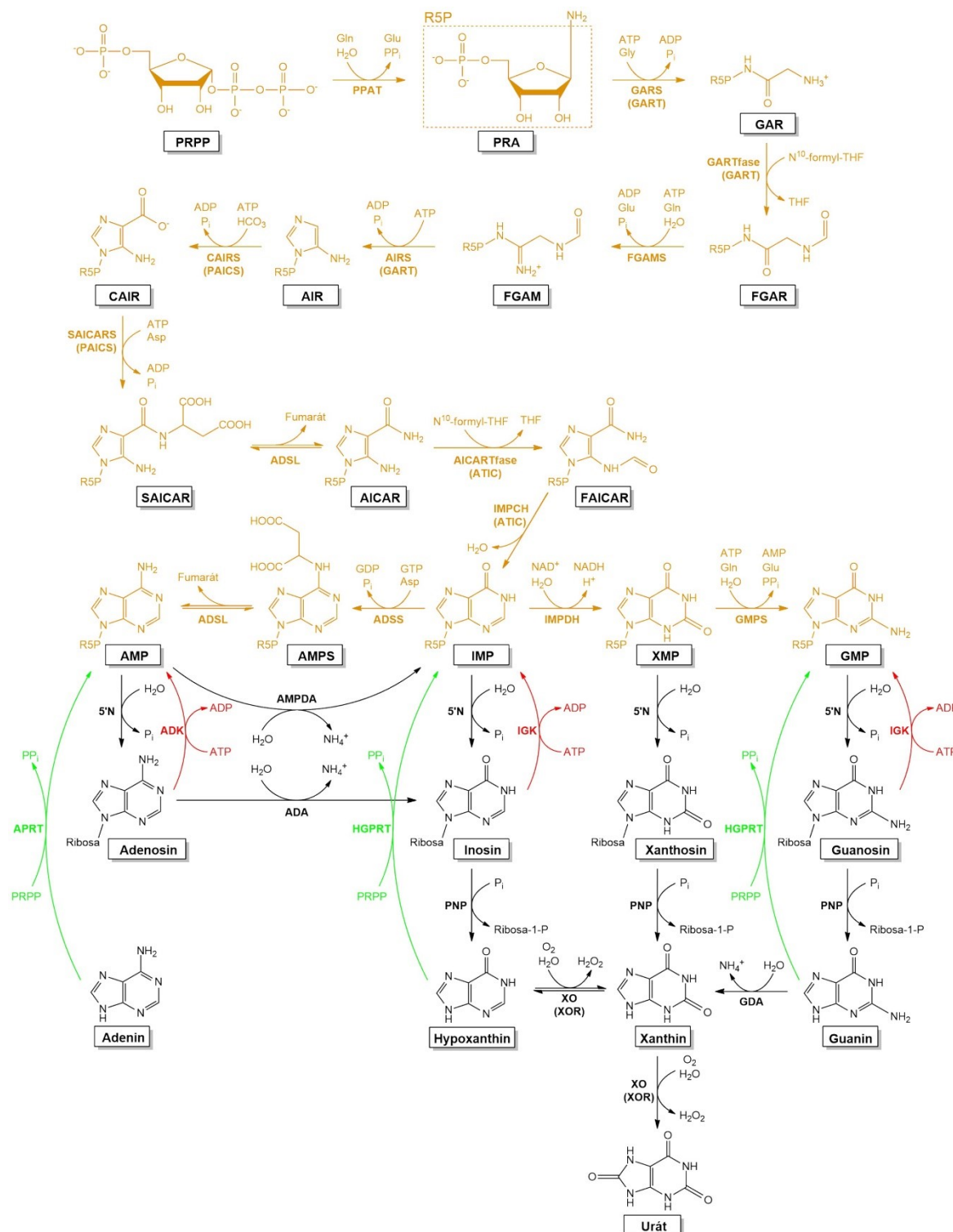
2.2.2 Resyntéza purinových nukleotidů

Purinové báze (adenin, guanin a hypoxanthin) a purinové nukleosidy (adenosin, inosin, guanosin) představují meziprodukty degradační dráhy a jsou v procesu resyntézy (Obrázek 2, str. 16) recyklovány katalytickou činností několika enzymů zpět na příslušné nukleotidy. Resyntéza tedy udržuje stabilní koncentraci těchto nukleotidů, které by jinak byly odbourány degradační drahou. Hypoxanthin a guanin jsou recyklovány enzymem hypoxanthin-guanin fosforibosyl transferasa (HGPRT; EC 2.4.2.8), který katalyzuje jejich reakci s 5-fosforibosyl-1-pyrofosfátem (PRPP) za vzniku IMP, resp. GMP. Adenin je reakcí s PRPP v katalytické přítomnosti enzymu adenin fosforibosyl transferázy (APRT; EC 2.4.2.7) přeměněn na AMP [2, 11, 15]. V současné době se pod pojmem resyntézy purinových nukleotidů (*angl.* "purine salvage pathway") rozumí pouze činnost enzymů HGPRT a APRT. Nicméně ve starší literatuře se do resyntézy zahrnují ještě dva další enzymy. Adenosin kinasa (ADK; EC 2.7.1.20) katalyzuje fosforylaci adenosinu, inosin-guanosin kinasa (IGK; EC 2.7.1.73) pak fosforylaci inosinu a guanosinu [11, 15]. Produkty těchto reakcí jsou tak opět příslušné nukleotidy.

2.2.3 De novo syntéza purinových nukleotidů

De novo syntéza purinových nukleotidů je vysoce konzervovanou metabolickou drahou, jež celá probíhá v cytoplasmě [6]. Za spotřeby čtyř až šesti molekul ATP (v závislosti na druhu organismu, u člověka pět molekul ATP [2]) při ní postupně dochází k výstavbě purinového kruhu na molekule PRPP. V deseti na sebe navazujících reakčních krocích tak vzniká z nízkomolekulárních sloučenin (glycin, aspartát, glutamin, 10-formyl-tetrahydrofolát, kyselina uhličitá) molekula IMP (Obrázek 2, str.16) [5-7]. Zatímco například v buňkách bakterií je těchto deset reakčních kroků katalyzováno deseti až

dvanácti různými enzymy, lidské buňky potřebují pouhých šest různých enzymů, z nichž některé jsou schopné katalyzovat více odlišných reakcí, jsou tzv. multifunkční [5, 7].



Obrázek 2 – Metabolismus purinů – hlavní koordinované procesy sloužící k regulaci hladiny purinů v buňce:

De novo syntéza (oranžová barva), resyntéza (zelená barva), reakce resyntézy uvedené ve starší literatuře (červená barva) a degradace purinů (černá barva). Vysvětlivky zkratk mezproduktů: PP_i – pyrofosfátový iont; PRPP – fosforibosylpyrofosfát; R5P – ribosa-5-fosfát; PRA – fosforibosylamin ribonukleotid; GAR – fosforibosylglycinamid; FGAR – N-formylglycinamid ribonukleotid; FGAM – N-formylglycinamidin ribonukleotid; AIR – aminoimidazol ribonukleotid; CAIR – karboxyaminoimidazol ribonukleotid; SAICAR – N-succinyl-5-aminoimidazol-4-karboxamid

ribonukleotid; AICAR – 5-aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotid; FAICAR – N-formylaminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotid; IMP – inosin monofosfát; AMPS – adenylosukcinát; AMP – adenosin monofosfát; XMP – xanthin monofosfát; GMP – guanosin monofosfát; zkratky enzymů katalyzujících jednotlivé reakce I-X vysvětluje *Tabulka 1*, str. 17, zkratky ostatních enzymů jsou uvedeny v textu. Obrázek reakčního schématu byl vytvořen v programu ChemBioDraw Ultra12.0.2 (© 1986 - 2010 CambridgeSoft).

Výše zmíněné nízkomolekulární látky potřebné k biosyntéze IMP pocházejí z různých zdrojů. Glycin je vedlejším produktem serinového metabolismu v mitochondriích, aspartát a glutamin jsou meziprodukty mitochondriálního Krebsova cyklu, kofaktor 10-formyl-tertahydrofolát (N^{10} -formyl-THF) je také dodáván mitochondriemi [2]. Pojem *de novo* syntéza purinových nukleotidů představuje pouze biosyntézu IMP, nicméně v této práci je do tohoto pojmu společně zahrnuta i následná přeměna IMP na kýžené purinové nukleotidy AMP a GMP. Průběh *de novo* syntézy biosyntézy IMP znázorňuje *Obrázek 2*, str. 16. Enzymy katalyzující jednotlivé kroky této biosyntézy, jsou pro přehlednost uvedeny v *Tabulce 1*.

Tabulka 1 – Jednotlivé reakční kroky I-X v biosyntéze IMP (viz odstavec níže) katalyzují různé enzymy

V tabulce jsou také uvedeny používané zkratky těchto enzymů a jejich zařazení do enzymové klasifikace (EC). Enzymy GARS, GARTfase a AIRS jsou součástí multifunkčního enzymu **GART** (žlutě označení); CAIRS a SAICARS jsou součástí **PAICS** (purpurové označení); AICARTfase a IMPCH jsou součástí **ATIC** (zelené označení).

Reakční krok	Název enzymu	Zkratka	EC
I.	PRPP amidotransferasa	PPAT	2.4.2.14
II.	fosforibosylglycinamid synthetasa	GARS	6.3.4.13
III.	fosforibosyl glycinamid formyltransferasa	GARTfase	2.1.2.2
IV.	fosforibosyl formylglycinamidin syntasa	FGAMS	6.3.5.3
V.	fosforibosyl aminoimidazol synthetasa	AIRS	6.3.4.1
VI.	karboxyaminoimidazol ribonukleotid synthetasa	CAIRS	4.1.1.21
VII.	N-sukcinyl-5-aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotid synthetasa	SAICARS	6.4.2.6
VIII.	adenylosukcinát lyasa	ADSL	4.4.2.2
IX.	5-aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotid transformylasa	AICARTfase	2.1.2.3
X.	IMP cyklohydrolasa	IMPCH	3.5.4.10

Tři z šesti enzymů, které katalyzují biosyntézu IMP, jsou multifunkční: GART, PAICS a ATIC (viz *Obrázek 2*, str. 16, a *Tabulka 1*). Geny multifunkčních enzymů vznikly evolučním propojením genů pro samostatné enzymy. Expresí tak vzniká fuzní protein, jehož polypeptidový řetězec obsahuje několik aktivních míst zapojených enzymů. Multifunkční enzym GART je tvořen enzymy GARS, GARTfase a AIRS katalyzující II., III. a V. reakční krok. Další multifunkční enzym PAICS obsahuje CAIRS a SAICARS pro

VI. a VII. reakční krok. Třetí multifunkční enzym ATIC obsahuje CAIRS a SAICARS katalyzující IX. a X. reakční krok [2, 5, 7]. Důvod pro spojení několika enzymových domén do jednoho polypeptidového řetězce byl v minulosti intenzivně diskutován a zabývá se jím dále kapitola 2.3.3.

IMP představuje větvící bod v biosyntéze purinových nukleotidů, neboť tento metabolit může být převeden na AMP nebo GMP (*Obrázek 2*, str. 16). K přeměně na AMP dochází ve dvou reakčních krocích katalyzovaných adenylosukcinát synthasou (ADSS; EC 6.3.4.4) a ADSL. Vznik GMP z IMP je katalyzován enzymy IMP dehydrogenasou (IMPDH; EC 1.1.1.205) a GMP synthetasou (GMPS; EC 6.3.5.2). Z reakčního schématu (*Obrázek 2*, str. 16) je patrné, že pro přeměnu IMP na AMP musí buňka využít energii molekuly GTP a pro přeměnu IMP na GMP pak energii molekuly ATP [2, 5, 7]. AMP a GMP mohou být dále fosforylovány adenylát kinasou (AK; EC 2.7.4.3) nebo guanylát kinasou (GK; EC 2.7.4.8) na příslušné nukleosid difosfáty. Nukleosid difosfát kinasa (NDK; EC 2.7.4.6) nakonec katalyzuje fosforylaci ADP i GDP za vzniku ATP a GTP. Všechny zmíněné kinasy (AK, GK, NDK) využívají jako donor fosfátu molekulu ATP [5, 6].

2.3 Regulace metabolismu purinových nukleotidů

Regulace metabolismu purinových nukleotidů je zajištěna synchronizací degradace, resyntézy a *de novo* syntézy. Každá z těchto drah je regulována několika mechanismy, které jsou popsány níže.

2.3.1 Regulace degradace purinových nukleotidů

Degradace purinových nukleotidů v savcích buňkách je řízena především aktivitou enzymu XOR a enzymů rodiny 5'-nukleotidas. Problematikou regulace 5'-nukleotidas se zabývá kapitola 2.6. Enzym XOR katalyzuje přeměnu substrátů hypoxanthinu a xanthinu na urát. Vedlejšími produkty těchto přeměn jsou některé reaktivní formy kyslíku (ROS), jako např. peroxid vodíku (H_2O_2) nebo superoxidový aniont (O_2^-). XOR vytváří, homodimer, spadá do rodiny metalo-flavoproteinů a pro jeho aktivitu je nezbytný kofaktor FAD, molybdopterinový komplex a Fe/S centra [13]. Může se vyskytovat ve dvou odlišných katalytických formách: xanthin oxidasa (XO; EC 1.17.4.2) nebo xanthin dehydrogenasa (XDH; EC 1.17.1.4). Jedna forma může přecházet ve druhou a naopak, typ formy závisí na stavu oxidace thiolových skupin v proteinu, které mění tvar místa pro navázání FAD. Jsou-li thiolové skupiny oxidované a tvoří disulfidové vazby, existuje enzym ve formě XO

a přenáší elektrony ze substrátů na molekulu O_2 . Pokud jsou thiolové skupiny naopak redukovány, existuje ve formě XDH a je schopen přenášet elektrony jak na O_2 , tak i na NAD^+ . K NAD^+ má však mnohem větší afinitu.

Míra exprese enzymu je řízena na úrovni transkripce, jež je ovlivňována oxidativním stresem. Hypoxie aktivuje transkripci XOR, zatímco hyperoxie ji inhibuje. Oxidativní stres se podílí také na regulaci aktivity enzymu na post-translační úrovni, kdy dochází k "přepínání" mezi aktivní a neaktivní formou XOR. Při hypoxii dochází k fosforylaci enzymu kinasou p38, což zvyšuje jeho aktivitu. Hyperoxie má na enzym naopak deaktivující účinky. Experimentální sulfurylace neaktivní formy vedla k obnovení na aktivní formu, což naznačuje, že mechanismus deaktivace patrně zahrnuje konverzi XOR na desulfo-XOR. Mezi další deaktivující regulátory XOR se řadí peroxynitrit ($ONOO^-$), jenž je produktem oxidace endogenního oxidu dusnatého (NO), či třeba superoxidové anionty a peroxid vodíku, což jsou právě jedny z vedlejších produktů katalytické aktivity XOR. Tato regulace aktivity XOR tak limituje rychlost celé degradace purinových nukleotidů [16].

2.3.2 Regulace resyntézy purinových nukleotidů

Resyntéza je zprostředkována enzymy APRT a HGPRT, které mají za úkol recyklovat purinové báze vzniklé při degradaci. Enzym HGPRT katalyzuje reakci hypoxanthinu nebo guaninu s molekulou PRPP za vzniku IMP, resp. GMP, a pyrofosfátu (viz *Obrázek 2*, str. 16). Regulace tohoto enzymu není známa, jeho fyziologická úloha je objasněna především díky patologickým stavům způsobených jeho dysfunkcí. V současnosti je popsáno několik desítek mutací v lidském genu HPRT1 (gen kódující HGPRT), které vedou ke ztrátě katalytické aktivity HGPRT a způsobují metabolickou poruchu zvanou Lesch-Nyhanův syndrom. [17].

Enzym APRT katalyzuje reakci adeninu s molekulou PRPP za vzniku AMP a pyrofosfátu (*Obrázek 2*, str. 16). Tvoří homodimer [18], pro jehož katalytickou aktivitu jsou nezbytné kationty Mg^{2+} (mohou být zastoupeny některými jinými bivalentními ionty jako např. Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}). Aktivita APRT je silně inhibována produkty – molekulami AMP a pyrofosfátu (PP_i). AMP působí jako kompetitivní inhibitor vůči PRPP a nekompetitivní vůči adeninu, PP_i je pak nekompetitivní vůči oběma substrátům [19]. Těmito mechanismy je regulována celá resyntéza purinových nukleotidů.

2.3.3 Regulace *de novo* syntézy purinových nukleotidů

De novo syntéza purinových nukleotidů je regulována na úrovni exprese odpovídajících genů, allosterickou regulací některých enzymů a formováním multienzymových komplexů. Podrobněji jsou tyto uvedené způsoby regulace popsány níže.

Exprese genů je regulována transkripčními faktory MYC a E2F, které se řadí mezi onkogeny. Kromě těchto genů reguluje faktor MYC hladinu některých enzymů jiných metabolických drah, které jsou s *de novo* syntézou propojeny, jako např. glykolýza a pentosofosfátová dráha, Krebsův cyklus [6].

Důležitým regulačním mechanismem je allosterická regulace několika klíčových enzymů, zejména pak PPAT, ADSS a IMPDH (viz *Obrázek 2*, str. 16). PPAT katalyzuje přeměnu PRPP na fosforibosylamin (PRA), tedy první reakční krok *de novo* syntézy, který je považován za limitující krok celé dráhy [6]. Enzym ve své struktuře obsahuje dvě allosterická místa, která se nacházejí blízko aktivního místa a do nichž se mohou vázat koncové produkty této dráhy. Do jednoho allosterického místa se mohou specificky vázat adeninové nukleotidy AMP, ADP, ATP, do druhého guaninové nukleotidy GMP, GDP a GTP. Pokud se některé z těchto nukleotidů naváží do allosterických míst PPAT, dojde k inhibici jeho aktivity [2, 6, 7].

ADSS a IMPDH mají společný substrát IMP a jsou klíčovými enzymy v biosyntéze purinových nukleotidů z molekul IMP. ADSS katalyzuje reakci, v níž je IMP přeměněno na adenosylsukcinát (AMPS), který je pak přeměněn na AMP. Aktivita enzymu je allostericky inhibována vazbou koncového metabolitu, tj. AMP. IMPDH katalyzuje přeměnu IMP na XMP, což je meziprodukt pro vznik GMP. Také jeho aktivita je inhibována koncovým metabolitem, v tomto případě GMP [6].

Dalším důležitým enzymem pro regulaci purinového metabolismu je PRPP synthetasa. Tento enzym katalyzuje přeměnu ribosa-5-fosfátu na molekulu PRPP (viz *Obrázek 4*, str. 25), výchozí sloučeninu pro *de novo* syntézu. Vlastnostmi tohoto důležitého enzymu se podrobně zabývají kapitoly 2.4 a 2.5.

Vzhledem k tomu, že jsou v *de novo* syntéze zahrnuty multifunkční enzymy, došli vědci postupně ke spekulacím o ještě komplexnějším způsobu regulace *de novo* syntézy v podobě multienzymových komplexů [2, 6]. GART katalyzuje tři různé reakce, z nichž

dvě na sebe nenavazují (viz *Obrázek 2*, str. 16). Některé meziprodukty dráhy jsou navíc velmi reaktivní (např. PRA, jehož poločas života při fyziologických podmínkách je přibližně 5 sekund) a neřízená difuze v cytoplasmě by nejspíše vedla k nežádoucím reakcím či zániku meziproduktu. Tyto skutečnosti vedly k formulování hypotézy tvrdící, že se enzymy seskupují do multienzymového komplexu, který zrychluje a zabezpečuje tok (*angl.* channelling) meziproduktů v dané metabolické dráze. Tvorba těchto multienzymových komplexů, jež se obecně označují jako metabolony [2, 7], byla prokázána např. pro Krebsův cyklus, β -oxidaci mastných kyselin či pro glykolýzu [2, 7, 20, 21]. Existence tohoto komplexu v *de novo* syntéze purinových nukleotidů (tzv. purinosomu) byla prokázána teprve nedávno.

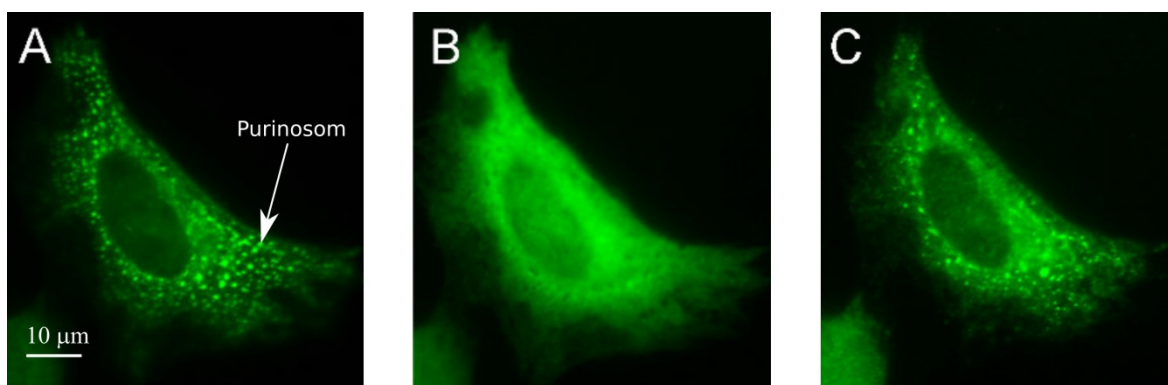
2.3.4 Purinosom

Purinosom je multienzymový komplex, v němž je všech šest enzymů *de novo* syntézy reversibilně asociováno do vzájemně těsné blízkosti. Tím chrání a izoluje reaktivní a nestabilní meziprodukty od okolního prostředí v buňce. Ke tvorbě purinosomů dochází především při nedostatku purinových nukleotidů v buňce a jejím okolí, kdy jediným možným zdrojem je *de novo* syntéza. Proces formování purinosomů je závislý na fázích buněčného cyklu a dochází k němu především v pozdní G1 fázi a S fázi, kdy jsou nároky na spotřebu nukleotidů zvýšené. V G2 a M fázi naopak počet viditelných komplexů v buňce dramaticky klesá [2].

Závislost tvorby purinosomů na vnějších zdrojích purinů byl prokázán experimentem, při němž byly buňky kultivovány v médiu bez purinů. V takto upravených podmínkách byl pozorován vznik purinosomů, jehož formování trvá v řádu jednotek až desítek minut (*Obrázek 3A*, str. 22). Ukázalo se, že se jedná o reversibilní proces, neboť vznik komplexů byl závislý na opakovaných změnách koncentrace purinů v médiu [22]. Tato vlastnost je znatelným rozdílem oproti metabolonům jiných drah, jejichž formování není tolik závislé na vnějších podmínkách.

Složení purinosomu

V jedné buňce bylo pozorováno přibližně 50-1000 komplexů s průměrnou velikostí 0,6 μm (pro srovnání – průměrná velikost většiny prokaryotních buněk je v rozmezí 1-10 μm). Bylo zjištěno, že jádro purinosomu tvoří první tři enzymy PPAT, GART a FGAMS. Toto jádro pravděpodobně tvoří proteinové lešení, na něž se vážou další enzymy této dráhy (PAICS, ADSL, ATIC). Součástí purinosomu jsou také ADSS a IMPDH, které nejsou přímou součástí *de novo* syntézy, ale katalyzují navazující reakce vedoucí k biosyntéze klíčových nukleotidů z IMP [23].



Obrázek 3 – Purinosomy v buňkách HeLa

(A) Purinosomy v buňce vznikají v reakci na vyčerpání zásoby purinů. Jejich správné formování zajišťují chaperony Hsp70 a Hsp90. (B) Inhibitor chaperonu Hsp90, NVP-AUY922, způsobuje rozklad purinosomů v buňce. (C) Pokud je inhibitor z buňky odstraněn a buňka vrácena do prostředí chudého na puriny, dochází k opětovnému vzniku purinosomů [24]. Obrázek byl upraven v programu Inkscape 0.92.1.

Fyziologické faktory ovlivňující formování purinosomu v buňce

Proces formování purinosomu ovlivňuje řada faktorů. Důležitá funkce pro jejich skládání a soudržnost byla prokázána pro chaperony Hsp70 a Hsp90 a několik dalších co-chaperonů. Tyto proteiny mají několik funkcí včetně napomáhání ke správnému sbalení řetězců jiných proteinů, účasti na formování a stabilizaci proteinových komplexů či zamezení nežádoucí agregace proteinů. V purinosomu asociují k FGAMS tvořící jeho jádro a napomáhají k formování a následné stabilizaci tohoto komplexu. Toto tvrzení bylo dokázáno v experimentu, při němž byl Hsp90 zablokován příslušnými inhibitory (17-AAG, NVP-AUY922), což vedlo k reversibilní disociaci komplexů (Obrázek 3A,B,C) [24]. Důležitou složkou purinosomů je též síť mikrotubulů, která zřejmě umožňuje jejich správnou distribuci v buněčném prostoru. Bylo zjištěno, že tato mikrotubulární síť není součástí aktinové buněčné sítě [25]. Zapojení mikrotubulů do tvorby purinosomů bylo

prokázáno působením nocodazolu (inhibitor polymerizace mikrotubulů) v buňkách HeLa, které vedlo ke znatelnému poklesu rychlosti *de novo* syntézy.

Purinosomy se nachází v blízkosti mitochondrií a bylo objeveno, že tento kontakt je ovlivněn mTOR kinasou. Ta prostřednictvím aktivace transkripčního faktoru 4 zvyšuje expresi methylenetetrahydrofolát dehydrogenasy 2 (MTHFD2), která se podílí na vzniku kofaktoru N¹⁰-formyl-THF. Inhibice mTOR kinasy sice nevede ke snížení počtu purinosomů, avšak projevuje se poklesem jejich interakce s mitochondriemi. Bylo prokázáno, že účelem kontaktu purinosomů s mitochondriemi je přísun N¹⁰-formyl-THF, který v mitochondriích vzniká a je nezbytný pro *de novo* syntézu [26]. Kromě toho jsou mitochondrie také zdrojem dalších substrátů (glycinu, aspartátu a glutaminu). Dalším důvodem může být spotřeba energie a přísun ATP. Umístění v blízkosti mitochondrií, které jsou mj. buněčnými továrnami pro výrobu ATP, by purinosomu zajišťovalo jeho výborný přísun. Využití energie molekul ATP v syntéze zároveň produkuje velké množství ADP a v mitochondriální membráně se nacházejí proteiny, které zajišťují jeho přenos přes membránu. V blízkosti mitochondrií by tak mohla probíhat dobrá výměna mezi ADP vyprodukovaným purinosomy a ATP vzniklým buněčnou respirací [2]. Výskyt purinosomů v blízkosti mitochondrií je tedy výhodný pro zajištění zdroje substrátů a energie pro *de novo* syntézu.

Patogenní mechanismy ovlivňující formování purinosomu

Abnormální formování purinosomů je také součástí patologických stavů. Pro deficit HGPRT se projevuje zvýšenou tvorbou purinosomů. Deficit HGPRT způsobuje narušení resyntézy a pokud nelze touto cestou účinně udržovat hladinu purinových nukleotidů, stává se tak jejich hlavním zdrojem *de novo* syntéza. Využití této dráhy se tak zvyšuje, což vede k nárůstu počtu purinosomů [27]. Opačný efekt, tedy sníženou schopnost tvorby purinosomů, způsobují mutace v genu pro ADSL a ATIC, které způsobují destabilizaci kvartérní struktury jednotlivých enzymů. Toto zjištění naznačuje, že formování purinosomu je závislé na nativních strukturách těchto enzymů [28]. Souhrn fyziologických a patologických faktorů, které ovlivňují formování purinosomů, je uveden v *Tabulce 2*, str. 23.

Tabulka 2 – Faktory ovlivňující formování purinosomů [2]

Fyziologické faktory	
Vedoucí k rozpadu purinosomů:	Vedoucí k formování purinosomů:
Dostatečná zásoba purinů	Deplece purinů
Inhibitory chaperonu Hsp90 (17-AAG a NVP-AUY922)	Inhibitory elektronového transportu a tím dýchacího řetězce v mitochondriích (antimycin A)
Inhibitor polymerizace mikrotubulů (nocodazol)	Inhibice oxidativní fosforylace v mitochondriích (oligomycin)
Patologické mechanismy	
Vedoucí k znemožnění formování purinosomů:	Vedoucí k formování purinosomů:
Mutace genů pro ADSL a ATIC	Nedostatek funkčního enzymu HGPRT

Vyšší proteinové struktury IMPDH

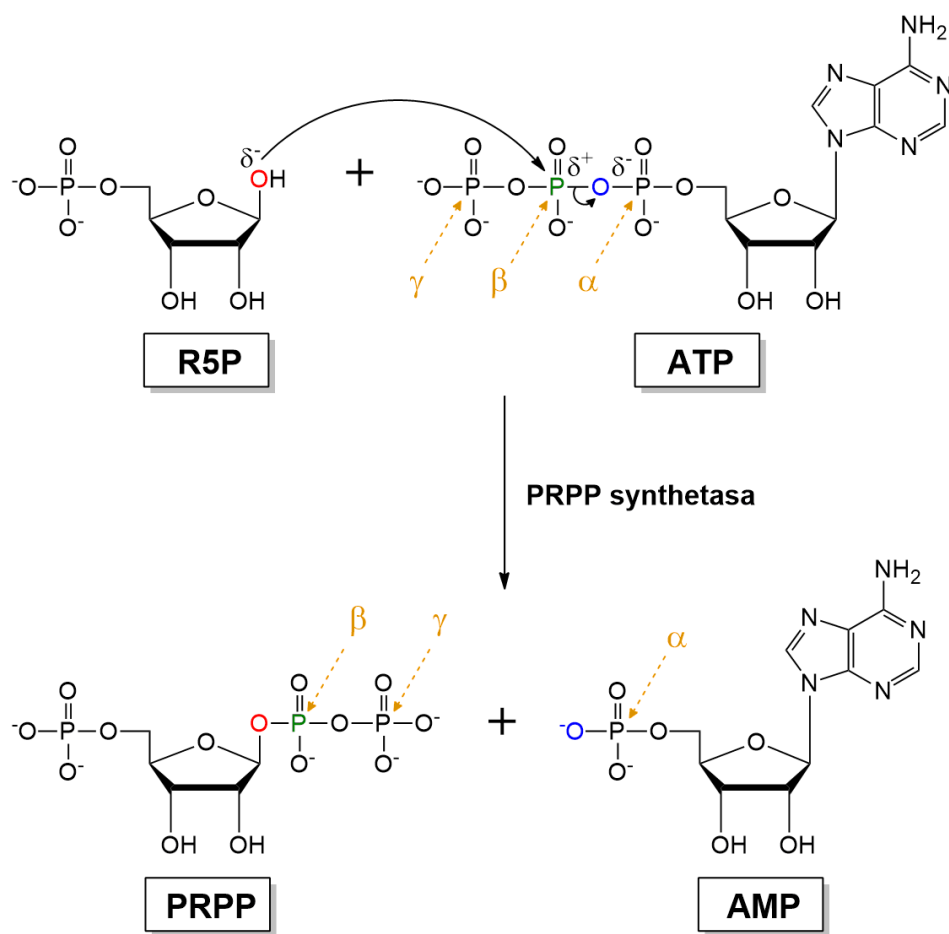
Další multienzymový komplex, který je do metabolismu purinů přímo zapojen, vytváří enzym IMPDH. Tento enzym využívá produkt *de novo* syntézy a katalyzuje přeměnu IMP na XMP, což představuje krok v produkci GMP (viz *Obrázek 2*, str. 16). Enzym může být součástí několika multienzymových komplexů. V závislosti na exprimované isoformě IMPDH a okolních podmínkách mohou být molekuly enzymu distribuovány samostatně v cytoplasmě, utvářet vláknité perinukleární (jádro obklopující) makrostruktury, prstencovité nebo tyčovité struktury anebo mohou být součástí purinosomů. Topologie komplexů IMPDH je závislá na buněčných podmínkách, především pak na koncentraci purinů. Hlavním elementem, který tuto topologii reguluje, je tzv. Batemanova doména považovaná za regulační část IMPDH [7].

Také PRPP synthetasy, jež katalyzují vznik PRPP, vytváří vyšší proteinové komplexy. O regulaci tohoto enzymu a jeho zapojení v nadmolekulárních strukturách pojednávají následující kapitoly 2.4 a 2.5 (na vyšší proteinové komplexy PRPP synthetas se zaměřuje kapitola 2.5.4).

2.4 Fosforibosylpyrofosfát synthetasy (PRS)

PRPP synthetasy (PRS; EC 2.7.6.1) jsou enzymy spadající do třídy transferas, které se s vysokou sekvenční podobností nacházejí v prokaryotních i eukaryotních organismech. Katalyzují syntézu PRPP, přičemž v jednom reakčním kroku zprostředkovávají přenos β,γ -difosfátu z molekuly ATP (popř. jiných nukleotidtrifosfátů) na C1' hydroxyskupinu

molekuly ribosa-5-fosfátu (R5P); (Obrázek 4, str. 25). Molekula PRPP je důležitým a nepostradatelným meziproduktem v metabolismu pyrimidinových a purinových nukleotidů (viz resyntéza a *de novo* syntéza purinů), při syntéze aminokyselin histidinu a tryptofanu či purinových nukleotidových koenzymů (NAD^+ a NADP^+) [29-33]. Jednotliví zástupci enzymové rodiny PRS se rozdělují do tří tříd, jež se od sebe liší v závislosti na fosfátovém iontu coby aktivátoru, v mechanismu allosterické regulace a typu donoru β,γ -difosfátu.



Obrázek 4 – Schéma reakce katalyzované PRPP synthetasami.

Na obrázku je oranžovou barvou naznačeno, kde se před a po proběhnutí reakce nacházejí α -, β - a γ -fosfát molekuly ATP. Vysvětlení zkratk: R5P – ribosa-5-fosfát; PRPP – fosforibosylpyrofosfát. Obrázek byl vytvořen v programu ChemBioDraw Ultra12.0.2 (© 1986 - 2010 CambridgeSoft.)

Většina známých zástupců PRS patří do třídy I, pro něž je charakteristické, že donorem β,γ -difosfátu jsou výhradně molekuly ATP. PRS této třídy jsou allostericky regulovány prostřednictvím molekul fosfátu (aktivátory) a ADP nebo GDP (inhibitory). [29, 32]. Zástupci třídy II se vyskytují specificky výhradně v rostlinách, jejich aktivita není závislá na molekulách fosfátu a postrádají allosterické místo pro vazbu ADP. Donorem

β,γ -difosfátové skupiny může být ATP, ale i z deoxyATP (dATP), uridin trifosfát (UTP), cytidin trifosfát (CTP) a GTP. Do třídy III spadají PRS, jejichž aktivita je aktivována molekulami fosfátu, ale není inhibována nukleosid difosfáty. Jako donor β,γ -difosfátové skupiny využívají ATP nebo dATP [29].

Zástupci lidských PRS jsou tři vysoce homologní isoformy (PRS-I, PRS-II a PRS-III) a všechny spadají do třídy I. Sekvenční identita činí 95,0 % mezi PRS-I a PRS-II, 94,3 % mezi PRS-I a PRS-III a 91,2 % mezi PRS-II a PRS-III. PRS-I a PRS-II jsou exprimovány ve všech tkáních, kdežto k expresi PRS-III dochází pouze ve varlatech. Dosud nejlépe byl z těchto tří lidských isoform prostudován PRS-I [29, 31].

2.5 Fosforibosylpyrofosfát synthetasa I (PRS-I)

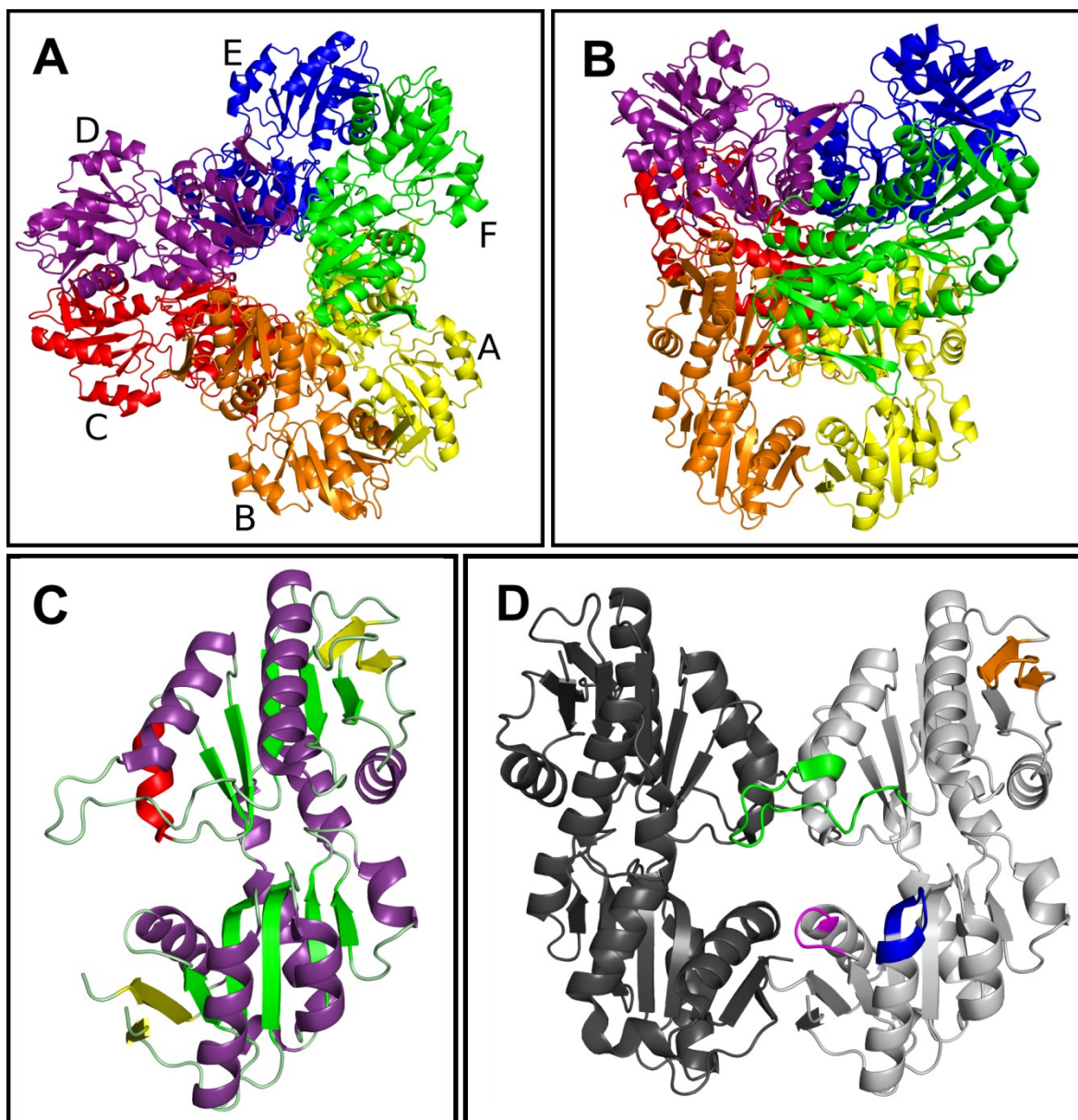
Lidský enzym fosforibosylpyrofosfát synthetasa I (PRPP synthetasa I, *zkr.* PRS-I) je kódován genem PRPS1 umístěným v dlouhém raménku chromosomu X o délce 957 párů bází. Sestřižený transkript genu PRPS1 obsahuje dvě specifická vazebná místa pro vazbu editovaného *miR-376*, což jsou 21 nukleotidů dlouhé molekuly RNA, které potlačují expresi genů na úrovni mRNA [34]. Translací PRPS1 genu vzniká 318 aminokyselin dlouhý polypeptidový řetězec [31] o molekulové hmotnosti 34 kDa [35].

Katalytická aktivita PRS-I je regulována především dvěma allosterickými efekty, ADP a fosfátovými ionty. Molekuly ADP inhibují aktivitu enzymu dvěma mechanismy. Fungují jako nejúčinnější allosterické inhibitory (o něco slabší inhibiční účinek mají molekuly GDP [30]) a působí také jako kompetitivní inhibitory vazby ATP v odpovídajícím vazebném místě (viz Struktura PRS-I, kapitola 2.5.1). Fosfátové ionty mohou také vykazovat dvojí účinek. Obvykle vystupují jako allosterické aktivátory, za určitých podmínek však mohou aktivitu enzymu inhibovat [29]. U rostliny *Hevea brasiliensis* (kaučukovník brazilský) bylo pozorováno, že při nízkých koncentracích R5P (v řádu desítek μM) aktivita PRS klesá s rostoucí koncentrací fosfátu (od jednotek až po desítky mM koncentrace fosfátu). Pokud se koncentrace R5P pohybovala v řádu jednotek mM, měla již vzrůstající koncentrace fosfátu obvyklý aktivační účinek [36]. Účinek fosfátu závisející na koncentraci R5P se vysvětluje tím, že při nízkých koncentracích R5P probíhá kompetice s fosfátem o R5P vazebné místo (viz Struktura PRS-I, kapitola 2.5.1) [30]. Aminokyselinová sekvence a struktura PRS z *Hevea brasiliensis* zatím nebyly určeny [37], lze se však domnívat, že tento dvojí účinek fosfátu se projevuje také u lidského PRS-I.

2.5.1 Struktura PRS-I

PRS-I se vyskytuje v podobě hexameru, který je tvořen třemi stejnými homodimery [3, 29, 33]. Homodimer (*Obrázek 5D*, str. 28) je složen z podjednotky A a podjednotky B, přičemž svou terciární strukturou jsou tyto podjednotky v podstatě totožné. Podjednotka každého ze tří homodimerů je tvořena dvěma doménami, které tvoří motiv β -sandwichové supersekundární struktury (*Obrázek 5C*, str. 28). Jádrem obou domén tvoří centrální pět řetězcový paralelní β -skládaný list. Tato centrální struktura je v N-terminální doméně obklopena čtyřmi α -helixy a jedním 3_{10} -helixem, v C-terminální doméně pak dvěma α -helixy z jedné a třemi z druhé strany. Obě domény také obsahují krátký antiparalelní β -skládaný list, jenž vystupuje z listu centrálního [29].

Tři homodimery hexameru jsou uspořádány do tvaru třílisté vrtule s trojčetnou osou symetrie (*Obrázek 5A*, str. 28). N-terminální domény homodimerů vytvářejí vnitřní kruh, zatímco C-terminální domény formují listy vrtulovitěho tvaru [29, 30]. Mezi podjednotkami hexameru jsou dva typy rozhraní. Prvním z nich je rozhraní mezi dvěma podjednotkami v rámci homodimeru, tzv. dimerní rozhraní [29]. Podjednotky jsou vůči sobě orientovány paralelně a jejich kontakt je zprostředkován skrze N-terminální i C-terminální domény obou podjednotek. Kontaktní povrch dimerního rozhraní je tvořen 11 % celkového dostupného povrchu každé z podjednotek [30]. Druhým typem je rozhraní mezi podjednotkami sousedících homodimerů, tzv. trimerní rozhraní [29]. Podjednotky jsou vůči sobě orientovány opět paralelně, ovšem kontakt mezi nimi je zprostředkován pouze skrze N-terminální domény [30]. Kontaktní povrch rozhraní mezi podjednotkami sousedících homodimerů je tvořen 13 % celkového dostupného povrchu každé z podjednotek. Na obou typech rozhraní působí velké množství hydrofobních i hydrofilních interakcí mezi vysoce konzervovanými aminokyselinovými zbytky [29]. Hexamerní uspořádání je klíčové pro správnou katalytickou funkci PRS-I, neboť pozice allosterických míst enzymu se nacházejí právě na dimerním a trimerním rozhraní.



Obrázek 5 – Krystalová struktura monomeru lidského enzymu PRS-I

(A) PRS-I tvoří hexamer, který je sestaven ze tří homodimerů PRS-I (viz C). Monomery A+B tvoří jeden homodimer, C+D tvoří druhý a E+F třetí; (B) Hexamer PRS-I z obrázku A centrován na jeden ze tří homodimerů struktury (žlutá a oranžová); (C) Struktura monomeru PRS-I je tvořena N-terminální doménou (horní část) a C-terminální doménou (dolní část), které společně vytváří motiv β -sandwichové struktury. Jádro obou domén tvoří 5řetězcový paralelní β -skládaný list (zeleně), který je obklopen několika α -helixy (fialově). Součástí obou domén je 2řetězcový antiparalelní β -skládaný list (žlutě). N-terminální doména obsahuje navíc 3_{10} -helix (červeně); (D) Struktura homodimeru PRS-I. Jedna podjednotka je zbarvena světle šedě, druhá tmavě šedě. Aktivní místo PRS-I je lokalizováno na každé jednotlivé podjednotce, zde je vyznačeno pouze na jedné podjednotce homodimeru. ATP vazebné místo je tvořeno flexibilní smyčkou (zeleně), vlajkovým regionem (oranžově) a pyrofosfát vázající smyčkou (purpurově). Modrý úsek ve struktuře vyznačuje R5P vazebné místo. Vysvětlivky zkratk: PRS-I – fosforibosylpyrofosfát syntetasa-I; R5P – ribosa-5-fosfát. Obrázek byl vytvořen v programu PyMOL verze 1.5.0.1 (DeLano Scientific LLC, San Francisco, CA, USA) za použití souboru PDB ID 2HCR.

2.5.2 Aktivní místo PRS-I

Aktivní místo PRS-I je tvořeno vazebnými místy pro substráty ATP a R5P. Obě vazebná místa se nacházejí na jedné podjednotce homodimeru a jsou tvořena vysoce konzervovanými aminokyselinovými zbytky. Vazbou substrátů do těchto příslušných vazebných míst dochází k jejich vhodné orientaci, čímž je usnadněna jejich reakce probíhající nukleofilní substitucí podle mechanismu S_N2 [38].

ATP vazebné místo

Vazebné místo pro ATP se nachází na rozhraní dvou domén jedné podjednotky homodimeru. Je tvořeno tzv. vlajkovým regionem (Val³⁰–Ile⁴⁴; *angl.* flag region), flexibilní smyčkou (Phe⁹²–Ser¹⁰⁸) a smyčkou vázající pyrofosfát (Asp¹⁷¹–Gly¹⁷⁴), viz *Obrázek 5D*, str. 28. ATP se do tohoto vazebného místa váže pouze svou adenosinmonofosfátovou částí molekuly, která interaguje pomocí vodíkových vazeb s postranními řetězci aminokyselinových zbytků Arg⁹⁶, Gln⁹⁷, Asp¹⁰¹ a His¹³⁰ jedné podjednotky a postranními řetězci Asn³⁷ a Glu³⁹ a hlavním řetězcem Phe³⁵ druhé podjednotky homodimeru. Uvedené aminokyseliny vazebného místa jsou vysoce konzervované napříč PRS enzymy mnoha prokaryotických a eukaryotických organismů. S β,γ -difosfátem interagují postranní řetězce Lys⁹⁹ a Lys¹⁷⁶, které již nejsou přímou součástí ATP vazebného místa [29].

Molekula ATP se do vazebného místa váže v komplexu s Mg^{2+} iontem, který pravděpodobně interaguje s karboxylovými skupinami postranních řetězců aminokyselinových zbytků Asp¹⁷¹ a Asp²²⁰. Obdobnou funkci jako Mg^{2+} iont mohou mít (ačkoliv s relativně nižší aktivitou) i další dvojvalné ionty kovů, jako např. Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} či Cd^{2+} [29]. Navázání ATP indukuje posun vlajkového regionu o 2-3 Å blíže k ATP vazebnému místu a umožňuje tak interakci tohoto regionu s adeninovou částí ATP. Flexibilní smyčka je zodpovědná za štěpení α - β fosfodiesterové vazby ATP. Pro rozštěpení této vazby je nepostradatelný Lys⁹⁹, který je součástí flexibilní smyčky a jehož případné nahrazení alaninem vede ke ztrátě katalytické funkce enzymu [33]. Flexibilní smyčka zaujímá otevřenou konformaci a to téměř nezávisle na přítomnosti ATP – v přítomnosti ATP dojde pouze k otočení postranního řetězce Gln⁹⁷ o 180°. Postranní řetězec Gln⁹⁷ se tak naváže vodíkovou vazbou na 2'-hydroxy skupinu ribosy v molekule ATP [29].

R5P vazebné místo

Vazebné místo pro R5P (*Obrázek 5D*, str. 28) je tvořeno úsekem aminokyselinových zbytků Asp²²⁰–Thr²²⁸ v C-terminální doméně, který tvoří vazebnou smyčku. Molekula R5P se do vazebného místa váže vodíkovými vazbami přes 5'-fosfát na amidy hlavního polypeptidového řetězce vysoce konzervovaných zbytků Asp²²⁴, Thr²²⁵, Cys²²⁶, Gly²²⁷ a Thr²²⁸. Do interakce se taktéž zapojují postranní řetězce Thr²²⁵ a Thr²²⁸ spolu s dvěma molekulami vody [29]. Na vstupu R5P do vazebného místa se podílí tzv. β9–10 řetězce, konkrétně zbytky Arg¹⁹⁶–Val²⁰². Pro správnou funkci tohoto β9–10 motivu jsou nezbytné vysoce konzervované zbytky aminokyselin Lys¹⁹⁴ a Arg¹⁹⁶. Náhradou těchto dvou residuí za Ala je poškozen mechanismus vstupu R5P do vazebného místa a dochází k úplné ztrátě katalytické funkce enzymu. Zásadní je také solný můstek mezi Asp¹⁸³ a His¹⁹³, jenž omezuje míru flexibility β9–10 řetězců [33].

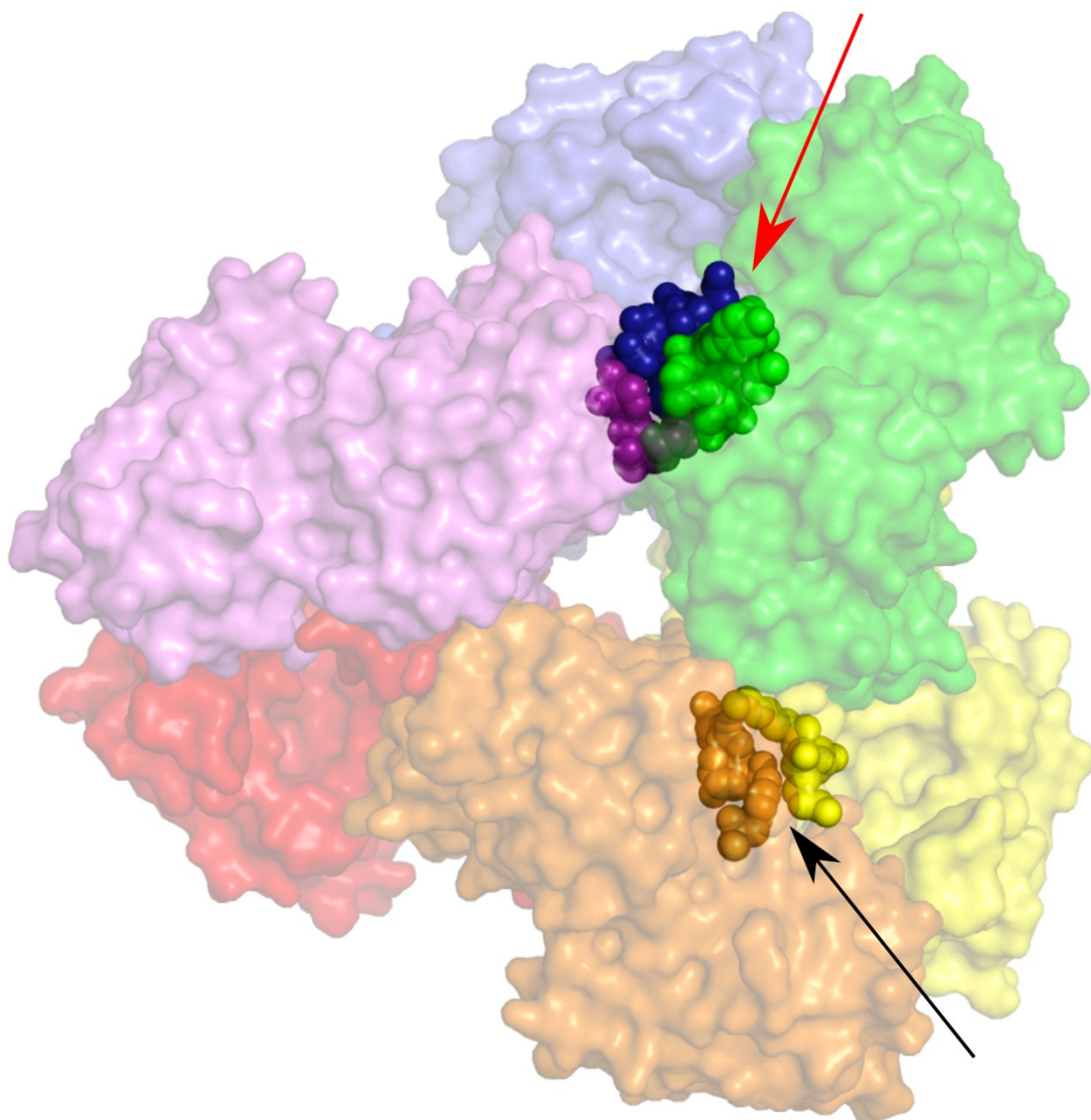
2.5.3 Allosterická místa

Katalytická aktivita PRS-I je regulována fosfátovými ionty a molekulami ADP jako koncovým produktem *de novo* syntézy. PRS-I obsahuje 2 specifická allosterická místa – tzv. allosterické místo I a allosterické místo II (*Obrázek 6*, str. 31). V závislosti na koncentraci mezi sebou soutěží ADP s fosfáty o vazbu do allosterického místa I. Do allosterického místa II se může vázat pouze molekula fosfátu.

Allosterické místo I (*Obrázek 6*, str. 31) se nachází na rozhraní mezi třemi různými podjednotkami hexameru. Je tvořeno konzervovanými aminokyselinovými zbytky Gln¹³⁵, Asp¹⁴³, Asn¹⁴⁴ a Ser³⁰⁸–Phe³¹³ jedné podjednotky, dále Lys¹⁰⁰–Arg¹⁰⁴, jež jsou součástí flexibilní smyčky druhé podjednotky, a Ser⁴⁷, Arg⁴⁹, Ala⁸⁰ a Ser⁸¹ třetí podjednotky. Fosfát se do allosterického místa váže vodíkovými vazbami s postranními řetězci aminokyselin Ser⁴⁷, Arg⁴⁹, Arg¹⁰⁴, Ser³⁰⁸, Ser³¹⁰ a s hlavním řetězcem Val¹⁰⁹ a Ser³¹⁰. Stejným způsobem je vázána i molekula ADP prostřednictvím své β-fosfátové skupiny.

Allosterické místo II (*Obrázek 6*, str. 31) leží na homodimerním rozhraní dvou podjednotek mezi ATP vazebným místem a allosterickým místem I. Fosfát interaguje s postranními řetězci Ser¹³², Gln¹³⁵, Asn¹⁴⁴ a Tyr¹⁴⁶ jedné podjednotky a hlavním proteinovým řetězcem v oblasti Lys¹⁰⁰, Asp¹⁰¹ a Lys¹⁰² flexibilní smyčky druhé podjednotky; do interakce je taktéž zapojena jedna molekula vody. V případě všech zmíněných interakcí se jedná o vodíkové vazby. Aminokyselinové zbytky účastníci se

vazby s fosfátem (Lys¹⁰⁰, Asp¹⁰¹, Lys¹⁰², Ser¹³², Gln¹³⁵, Asn¹⁴⁴ a Tyr¹⁴⁶) jsou vysoce konzervované napříč mnoha eukaryotními organismy kromě rostlinných PRS spadajících do třídy II (jejichž aktivita není závislá na iontech fosfátu a které postrádají i allosterické místo I). Naproti tomu v prokaryotních organismech se zbytky na těchto pozicích často liší, což naznačuje, že u nich výše zmíněné aminokyselinové zbytky konzervované nejsou a allosterické místo II tak v jejich struktuře patrně vůbec neexistuje [29].



Obrázek 6 – Vyznačení allosterických míst I a II v hexameru PRS-I

Jednotlivé monomery PRS-I jsou ukázány povrchovým znázorněním a atomy aminokyselinových zbytků, které tvoří allosterická místa, jsou zvýrazněny. Pro přehlednost bylo každé místo vyznačeno jednou. Červená šipka ukazuje na polohu allosterického místa I, které je umístěno na každém trimerním rozhraní a je tvořeno aminokyselinovými zbytky tří různých podjednotek (podjednotky jsou rozlišeny barvami zelenou, modrou a fialovou). Černá šipka ukazuje na allosterické místo II, které se nachází na každém dimerním rozhraní všech tří homodimerů a je tvořeno aminokyselinovými zbytky dvou různých podjednotek (na obrázku jsou rozlišeny barvami žlutou a oranžovou). Celkem tedy hexamer PRS-I obsahuje 6 allosterických míst I a 6 allosterických míst II. Obrázek byl upraven v programu Inkscape 0.92.1 a vytvořen v programu PyMOL verze 1.5.0.1 (DeLano Scientific LLC, San Francisco, CA, USA) za použití souboru PDB ID 2HCR.

2.5.4 Regulace aktivity PRS-I

Allosterická regulace

Vazba fosfátu do allosterického místa I indukuje konformační změny v aktivním místě, které stimulují aktivitu. K těmto konformačním změnám nemůže dojít v případě, že se do allosterického místa I naváže ADP, což zároveň způsobí zablokování allosterického místa II pro vazbu fosfátu. Tyto dva mechanismy jsou zodpovědné za inhibiční účinky ADP [29].

Vazba fosfátu v allosterickém místě II způsobuje konformační změnu, která stabilizuje otevřenou konformaci flexibilní smyčky ve vazebném místě pro ATP. Změna konformace také způsobí přiblížení vrcholu flexibilní smyčky k allosterickému místu I. Tím je stericky bráněno vstupu a navázání ADP a znemožněna inhibice enzymu [29].

Aktivita PRS-I je kromě allosterických efektorů ovlivněna ještě interakcí s tzv. PRS sdruženými proteiny (z *angl.* PRPP synthetase-associated proteins, *zkr.* PAPs), tj. PAP39 a PAP41. Tyto proteiny jsou součástí tzv. PRS proteinového komplexu [35, 39, 40], který lze zařadit k purinosomům a komplexům IMPDH (viz kapitola 2.3.4) podílející se na regulaci *de novo* syntézy purinových nukleotidů.

Regulace prostřednictvím meziproteinových interakcí

PRS-I tvoří proteinový komplex s třemi dalšími proteiny – PRS-II, PAP39 a PAP41. PRS-II je druhým ze tří zástupců lidských PRS a má stejnou katalytickou funkci jako PRS-I, kdežto PAP39 a PAP41 katalytickou funkci postrádají. Poměr zastoupení jednotlivých komponent v komplexu se liší v závislosti na druhu tkáně, v níž je tvořen. Přibližný poměr molekul PRS-I, PRS-II, PAP39 a PAP41 v komplexu byl určen 20:5:8:1 a relativní molekulová hmotnost komplexu překračuje hodnotu $1 \cdot 10^6$ [35].

Fyziologická role lidských PAP39 a PAP41 zatím nebyla prostudována [39, 40]. Předchozí studie provedené na krysích jaterních buňkách nicméně naznačují, že proteinové struktury PAP39 a PAP41 regulují aktivitu PRS-I a PRS-II [35]. Na základě vysoké sekvenční podobnosti mezi krysími a lidskými PAP39, PAP41, PRS-I a PRS-II (viz *Tabulka 3*, str. 33) se lze domnívat, že lidské PAP39 a PAP41 hrají v PRS proteinovém komplexu lidských buněk stejnou nebo podobnou roli jako příslušné proteiny v buňkách krysích.

Tabulka 3 - Míra identity aminokyselinových sekvencí mezi jednotlivými proteiny

Hodnoty jsou vyjádřeny v procentech (%). Sekvence využívané pro srovnání identity byly získány na <http://www.uniprot.org/>; k porovnání proteinových sekvencí byla použita internetová funkce <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

[%]	hPAP41	hPAP39	hPRS-II	hPRS-I		hPRS-I	hPRS-II	hPAP39	hPAP41
hPRS-I	45	43	95	–	rPRS-I	100	95	43	45
hPRS-II	45	44	–	96	rPRS-II	96	99	44	45
hPAP39	43	–	44	43	rPAP39	43	44	99	79
hPAP41	–	79	45	45	rPAP41	45	44	78	99
	rPAP41	rPAP39	rPRS-II	rPRS-I					

Kryší PAP39 (zkr. rPAP39) je, stejně jako lidský PAP39 (zkr. hPAP39), 356 aminokyselin dlouhý protein o molekulové hmotnosti 39 kDa. Jeho aminokyselinová sekvence sdílí 48% podobnost s kryší PRS-I (zkr. rPRS-I) a 49% podobnost s kryší PRS-II (zkr. rPRS-II). Kryší PAP41 (zkr. rPAP41) je, stejně jako lidský PAP41 (zkr. hPAP41), 369 aminokyselin dlouhý protein o molekulové hmotnosti 41 kDa. Jeho aminokyselinová sekvence sdílí 49% podobnost s rPRS-I a 49% podobnost s kryší rPRS-II. Vzájemná sekvenční podobnost mezi rPAP39 a rPAP41 (souhrnně rPAPs) je 79 %. Navzdory poměrně vysoké podobnosti s rPRS-I a rPRS-II postrádají rPAPs katalytickou aktivitu. To je pravděpodobně zapříčiněno především rozdíly v úsecích proteinové sekvence, které jsou pro katalytickou funkci naprosto klíčové [35].

Hlavním prvkem inhibujícím aktivitu rPRS-I a rPRS-II je rPAP39 a míra inhibice je závislá přímo úměrně na celkovém molárním množství rPAPs v komplexu. Mechanismus inhibice však nebyl dosud objasněn. Bylo zjištěno, že formování rPAPs je reversibilní, nepodílí se na něm disulfidové vazby a jádro komplexu tvoří rPRS-I a rPRS-II, přičemž rPAPs jsou navázány na jeho povrchu. Periferní proteiny tvoří vnější obal komplexu a mají tak patrně úlohu určité izolace od okolního prostředí [35].

2.5.5 Mutace PRS-I a s nimi spojené poruchy

Změny v aktivitě PRS-I jsou spojeny s různými zdravotními poruchami a onemocněními, jimiž jsou hyperurikosurie, hyperurikémie (dna), Artsův syndrom, choroba Charcot-Marie-Tooth, percepční nedoslýchavost, akutní lymfoblastická leukemie. Problematika akutní lymfoblastické leukemie je blíže popsána v samostatné kapitole 2.7. Na základě genetických a biochemických studií se ukázalo, že tyto odchylky jsou způsobeny dvěma mechanismy: zvýšenou expresí PRS-I a bodovými mutacemi v genu PRPS1, které ovlivňují aktivitu PRS-I (viz Tabulka 4, str. 34).

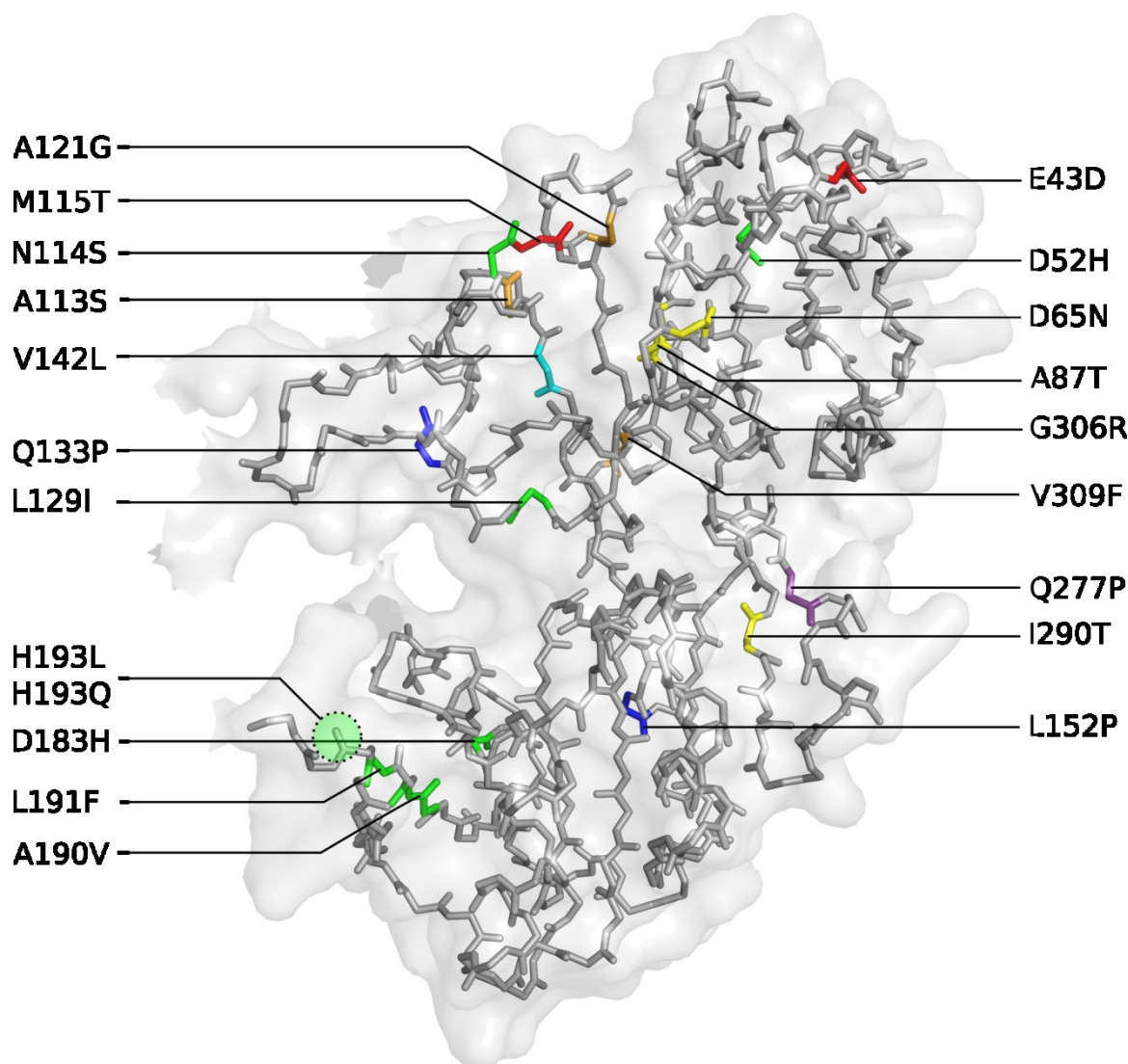
Tabulka 4 – Některé známé záměny aminokyselin ve struktuře PRS-I způsobené bodovými mutacemi. Tyto mutace ovlivňují aktivitu enzymu a způsobují rozličné poruchy.

Zkratky: dědičná choroba Charcot-Marie-Tooth (CMTX); dědičná percepční nedoslýchavost (DFNX)

Porucha	Mutace v genu PRPS1	Záměna aminokyselin	Efekt na aktivitu PRS-I ↑ (zvýšení) / ↓ (snížení)
CMTX5	c.129A>C	E43D	↓
Hyperaktivita	c.154G>C	D52H	↑
DFNX2	c.193G>A	D65N	↓
DFNX2	c.259G>A	A87T	↓
DFNX2 + CMTX5	c.337G>T	A113S	↓
Hyperaktivita	c.341A>G	N114S	↑
CMTX5	c.344T>C	M115T	↓
DFNX2 + CMTX6	c.343A>G	M115V	↓
DFNX2 + CMTX8	c.362C>G	A121G	↓
Hyperaktivita	c.385C>A	L129I	↑
Artsův syndrom	c.398A>C	Q133P	↓
Hyperaktivita + Artsův syndrom	c.424G>C	V142L	↑
Artsův syndrom	c.455T>C	L152P	↓
Hyperaktivita	c.547G>C	D183H	↑
Hyperaktivita	c.569C>T	A190V	↑
Hyperaktivita	c.573G>C	L191F	↑
Hyperaktivita	c.578A>T c.579C>G	H193L H193Q	↑
CMTX5 + Artsův syndrom	c.830A>C	Q277P	↓
DFNX2	c.869T>C	I290T	↓
DFNX2	c.916G>A	G306R	↓
DFNX2 + CMTX7	c.925G>T	V309F	↓

Zvýšená exprese PRS-I se projevuje zvýšenými hodnotami hladiny PRPP v buňkách a ústí ve zrychlenou degradaci purinových bází na kyselinu močovou. Je patrně zapříčiněna změnami v pre-translačním mechanismu genové exprese, přičemž PRS-I má normální kinetické vlastnosti [34, 41].

Bodové mutace mohou vést ke dvěma odlišným efektům na funkci PRS-I. Jedním možným efektem je zvýšení aktivity a zisk funkce (*angl.* gain of function) PRS-I, což se označuje jako hyperaktivita enzymu a způsobuje dnu a hyperurikosurii. Druhým možným efektem je snížení nebo úplná ztráta katalytické funkce (*angl.* loss of function), která může způsobovat Artsův syndrom, chorobu Charcot-Marie-Tooth, percepční nedoslýchavost nebo kombinace těchto onemocnění. Skupiny mutací projevující se stejnými symptomy a onemocněními (viz dále) jsou pro přehlednost vyznačeny ve struktuře PRS-I na *Obrázku 7*, str. 35.



Obrázek 7 – Bodové mutace PRS-I způsobující různé zdravotní poruchy a onemocnění

Ve struktuře jsou barevně rozlišeny skupiny mutací, které způsobují symptomy stejných onemocnění: hyperurikémie, hyperurikosurie a další onemocnění způsobená hyperaktivitou PRS-I (zelená); percepční nedoslýchavost (žlutá); choroba Charcot-Marie-Tooth (červená); Artsův syndrom (modrá); symptomy způsobené hyperaktivitou PRS-I spolu se symptomy Artsova syndromu (tyrkysová); symptomy percepční nedoslýchavosti spolu se symptomy choroby Charcot-Marie-Tooth (oranžová); symptomy choroby Charcot-Marie-Tooth spolu se symptomy Artsova syndromu (fialová). Obrázek byl upraven v programu Inkscape 0.92.1 a vytvořen v programu PyMOL verze 1.5.0.1 (DeLano Scientific LLC, San Francisco, CA, USA) za použití souboru PDB ID 2HCR.

Hyperaktivita PRS-I

Hyperaktivita PRS-I způsobuje nadprodukcí purinových nukleotidů. Následkem toho se zvyšuje hladina kyseliny močové v krvi. Zvýšená hladina vede ke vzniku hyperurikémie a nadměrnému vylučování kyseliny močové do moči, což je úzce spjato se vznikem močových kamenů (hyperurikosurie). Nadprodukce purinových nukleotidů je dále doprovázena hypotonií, ataxií, neurologickými poruchami (zejména mentální retardací) či percepční nedoslýchavostí (*angl.* Sensorineural Hearing Loss) [42, 43]. Zatím pouze

v jednom případě se projevila opožděným vývojem, nízkým vzrůstem, lehkými anomáliemi v obličeji, kongenitální poruchou a kryptorchismem [44]. Vyjmenovaná onemocnění a příznaky jsou v porovnání s příznaky způsobenými zvýšenou expresí PRS-I mnohem závažnější.

Dosud bylo popsáno několik mutací PRS-I, které vedou k hyperaktivitě enzymu: D52H, N114S, L129I, D183H, A190V, L191F, H193L a H193Q. Tyto mutace buďto přímo ovlivňují strukturní uspořádání allosterických míst I nebo II (D52H a L129I), nebo jsou lokalizovány na dimerním rozhraní a způsobují destabilizaci kvartérní struktury enzymu (N114S, D183H, A190V, L191F, H193L a H193Q). V důsledku toho je poškozena allosterická regulace enzymu vedoucí k hyperaktivitě PRS-I [45-47].

Mutace vedoucí ke snížené funkci PRS-I nebo její ztrátě

Mutace v PRS-I, které vedou k poklesu nebo úplné ztrátě aktivity enzymu, jsou spojeny s několika dědičnými poruchami: percepční nedoslýchavost, choroba Charcot-Marie-Tooth a Artsův syndrom.

Dědičná percepční nedoslýchavost (*angl.* X-linked nonsyndromic sensorineural deafness, *zkr.* DFNX) je gonosomální porucha, která se projevuje poškozením sluchu nebo jeho úplnou ztrátou. Dosud byly popsány čtyři mutace způsobující DFNX: D65N, A87T, I290T a G306R. Tyto mutace lze podle možného strukturního mechanismu rozdělit do dvou skupin: mutace narušující své okolí (A87T a I290T) a varianty měnící trimerní rozhraní a globální stabilitu hexameru (D65N a G306R) [34, 48].

Choroba Charcot-Mari-Tooth (*angl.* X-linked Charcot-Marie-Tooth disease, *zkr.* CMTX) je vzácným dědičným onemocněním, pro nějž jsou charakteristické tři hlavní symptomy: periferní neuropatie, optická atrofie a hluboká percepční nedoslýchavost objevující se v prelingválním věku (věk před vývojem řeči). Tyto symptomy mohou být v pozdějším věku (5-20 let) doplněny hypotonií, poruchami chůze aj [49]. Zatím jsou známy dvě mutace v PRPS1, které tuto chorobu způsobují: E43D a M115T. Obě mutace jsou součástí trimerního rozhraní, způsobují jeho destabilizaci a tím narušují ATP vazebné místo i allosterické místo I [34, 50].

Artsův syndrom (*angl.* Arts syndrome) je tou nejzávažnější dědičnou poruchou zapříčiněnou deficitem PRS-I. Projevuje se již v raném dětství a mezi symptomy

onemocnění patří hypotonie, hluboká percepční nedoslýchavost, opožděný vývoj motoriky, mentální retardace, ataxie, atrofie zrakového nervu a některé další. Onemocnění je smrtelné, 80 % pacientů postižených tímto syndromem umírá před šestým rokem stáří. [34, 41]. Dosud byly popsány dvě mutace, které způsobují Artsův syndrom: Q133P a L152P. Obě mutace narušují ATP vazebné místo, což vede ke ztrátě aktivity enzymu [33, 34, 51].

Mutace projevující se symptomy více poruch zároveň

Některé mutace PRS-I se projevují symptomy více nemocí najednou. Mohou tak způsobovat různé příznaky charakteristické pro DFNX a také pro CMTX, příznaky charakteristické pro CMTX a z části také pro Artsův syndrom či příznaky způsobené hyperaktivitou PRS-I a přitom také charakteristické pro Artsův syndrom.

Symptomy, které jsou charakteristické pro DFNX spolu s CMTX, se projevují mutace A113S, M115V, A121G a V309F. Těmito symptomy jsou postlingvální (po ukončení vývoje řeči – kolem 6. roku života) ztráta sluchu a formy periferní neuropatie. Všechny čtyři mutace se nacházejí na trimerním rozhraní, což je charakteristické i pro mutace způsobující pouze CMTX, a ovlivňují aktivní místo PRS-I [52, 53].

Mutace Q277P je zatím jedinou popsanou mutací, která způsobuje symptomy charakteristické pro CMTX a částečně také pro Artsův syndrom. Mutace se nachází na trimerním rozhraní PRS-I, což je konzistentní s výskytem mutací způsobujících CMTX. Ovlivňuje aktivní místo enzymu a zejména jeho R5P vazebnou část, avšak allosterická místa nejsou ovlivněna. Následkem je tak ztráta aktivity PRS-I [54].

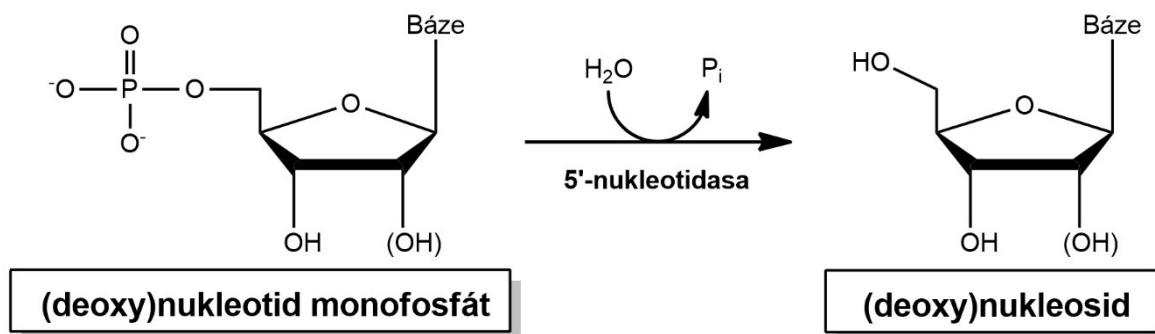
Zvláštním případem je mutace V142L. V pacientovi, u něž byla nalezena, způsobila hyperaktivitu PRS-I a nadprodukcí kyseliny močové. Projevovala se charakteristickými příznaky těžké formy hyperaktivity PRS-I, tj. opožděným vývojem, hypotonií a ztrátou sluchu – překvapivě však mezi těmito příznaky chyběla dna. Namísto toho byly pozorovány příznaky charakteristické pro Artsův syndrom [55].

2.6 Cytosolická purinová 5'-nukleotidasa II (cN-II)

Lidský enzym cytosolická purinová 5'-nukleotidasa II (cN-II; EC 3.1.3.5), taktéž nazývaná jako IMP-GMP specifická nukleotidasa, je jednou ze sedmi známých lidských enzymů rodiny 5'-nukleotidas, které katalyzují hydrolytickou defosforylaci (deoxy)nukleosid monofosfátů za vzniku příslušných (deoxy)nukleosidů (*Obrázek 8*, str. 38). Jsou klíčovou

součástí degradační dráhy purinových nukleotidů (kapitola 2.2.1) a spolu s nukleosid kinasami (kapitola 2.2.2) se podílejí na regulaci hladiny těchto nukleotidů [56].

Všech sedm enzymů této 5'-nukleotidasové rodiny (cytosolické 5'-nukleotidasy cN-IA, cN-IB, cN-II a cN-III; mdN – mitochondriální 5'(3')-nukleotidasa; cdN – cytosolická 5'(3')-nukleotidasa nazývaná též ecto-nukleotidasa) se vzájemně liší ve své primární struktuře, substrátové specifitě, způsobu regulace, lokalizaci v buňce a také typu tkáně, ve které jsou exprimovány. Sdílí však mezi sebou čtyři vysoce konzervované strukturní motivy, které jsou společným strukturním znakem enzymů patřících do haloacidní dehalogenasové rodiny (HAD, *angl.* haloacid dehalogenase superfamily). Tyto motivy jsou klíčové pro zachování jejich nukleotidasové aktivity a substrátové specifity, neboť jsou důležitou součástí aktivního místa cN-II [57]. Tři z těchto motivů uvádí *Obrázek 9A*, str. 41.



Obrázek 8 – Schéma defosforylační reakce (deoxy)nukleosid monofosfátů katalyzované 5'-nukleotidasami

Obrázek reakčního schématu byl vytvořen v programu ChemBioDraw Ultra12.0.2 (© 1986 - 2010 CambridgeSoft).

2.6.1 Katalytická aktivita cN-II

cN-II se společně s cN-III od zbylých čtyř 5'-nukleotidas liší, neboť vykazují dvě různé katalytické aktivity: hydrolytickou a fosfotransferasovou [56].

Hydrolytická aktivita již byla popsána v úvodu této kapitoly a enzym při ní preferuje substráty (deoxy)IMP, (deoxy)GMP a XMP [58]. Fosfotransferasovou aktivitou fosforyluje molekuly purinových nukleosidů, zejména inosinu a deoxyinosinu, přičemž donorem fosfátu mohou být purinové i pyrimidinové (deoxy)nukleotid monofosfáty. Přenos fosfátu z těchto donorů na akceptory probíhá přes kovalentní fosfo-(cN-II) intermediát [59]. Obě katalytické aktivity enzymu jsou allostericky regulovány. Přítomnost aktivátorů 2,3-bisfosfoglycerátu (2,3-BPG), adenosinových sloučenin (deoxy)ATP, (deoxy)ADP, diadenosin tetrafosfátu (Ap₄A) či některých diadenosin polyfosfátů (Ap_xA,

kde x má hodnotu 4, 5 nebo 6) je podmínkou pro dosažení plné aktivity enzymu. IMP a fosfátové ionty, jež jsou produkty hydrolytické aktivity cN-II, mají na enzym inhibiční efekt [58]. Tyto allosterické efekторы se vážou do nejméně dvou allosterických míst ve struktuře enzymu (viz níže).

2.6.2 Struktura cN-II

Enzym cN-II je kódován genem NT5C2 o délce 3173 bp, jehož translací vzniká 561 aminokyselin dlouhý polypeptidový řetězec o molekulové hmotnosti 65 kDa [60]. Je exprimován ve všech tkáních a v nativním stavu tvoří homotetramer [58], který sestává ze dvou identických homodimerů (*Obrázek 9C*, str. 41, [57]). Rozhraní mezi dvěma podjednotkami homodimeru se označuje jako tzv. rozhraní A a je tvořeno 53 aminokyselinovými zbytky, z nichž 4 vytváří solné můstky a 19 interaguje vodíkovými vazbami s přilehlou podjednotkou. Oba homodimery tetrameru jsou drženy pohromadě pomocí tzv. rozhraní B, které je tvořeno 28 aminokyselinovými zbytky, z nichž 8 interaguje vodíkovými vazbami s přilehlou podjednotkou druhého homodimeru. Souhrnně se obě rozhraní označují jako oligomerní.

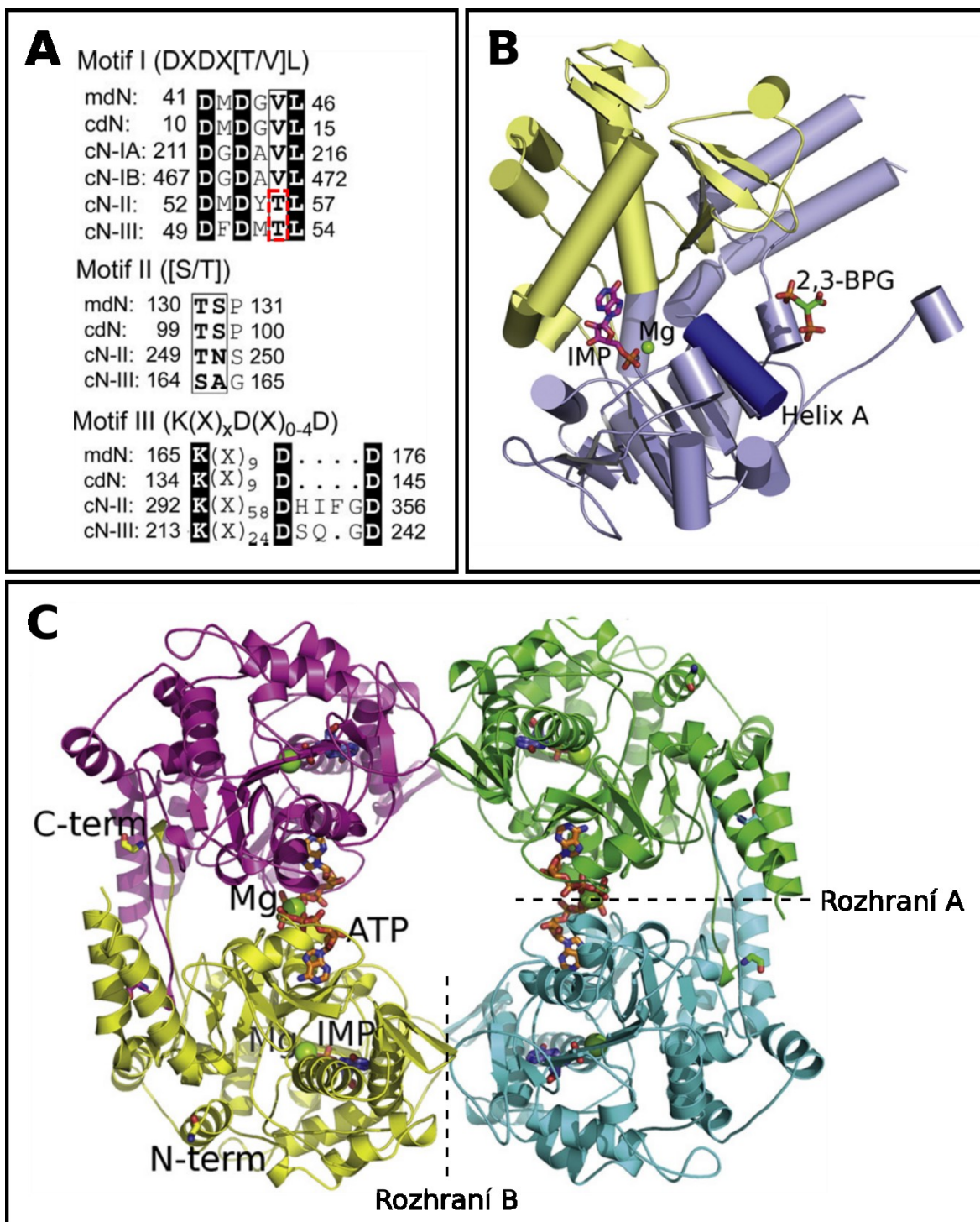
Každá podjednotka (*Obrázek 9B,C*, str. 41) je tvořena dvěma doménami. První z nich se nazývá jako "core" (jádro, *angl.* core domain) a její součástí jsou všechny čtyři konzervované motivy. Motiv I je patrně zodpovědný za fosfotransferasovou aktivitu cN-II a cN-III, neboť v tomto motivu obsahují konzervovaný aminokyselinový zbytek Thr (viz *Obrázek 9A*, str. 41), kdežto ostatní 5'-nukleotidasy zde obsahují konzervovaný Val [57]. Součástí "core" domény je také tzv. helix A, který hraje klíčovou roli v mechanismu allosterické aktivace enzymu. Druhá doména je tvořena čtyř-helixovým svazkem a je nazývána jako "cap" doména ("čepička", *angl.* cap domain). Mezi těmito doménami se nachází aktivní místo enzymu, do něhož se prostřednictvím Mg^{2+} iontu vážou (deoxy)nukleosid monofosfáty, přičemž ribonukleosidy jsou preferovány před deoxyribonukleosidy a purinové nukleosidy před pyrimidinovými [58]. Součástí struktury každé podjednotky jsou též nejméně dvě regulační allosterická místa: allosterické místo 1 a allosterické místo 2. Allosterické místo 1 se nachází blízko homodimerního rozhraní A a mohou se do něj vázat efekторы 2,3-BPG, (deoxy)ATP či Ap_4A . Tyto efekторы se elektrostatickými interakcemi podílí na interakci mezi dvěma podjednotkami homodimeru [57]. Allosterické místo 2 se patrně nachází poblíž aktivního místa a do rozhraní A i B

nezasahuje [61]. Mohou se do něj vázat molekuly 2,3-BPG a (deoxy)ATP. Obě allosterická místa jsou klíčová pro správnou regulaci katalytické aktivity enzymu.

2.6.3 Allosterická regulace aktivity a její poruchy

Aktivita cN-II závisí na hladině energie, tj. koncentraci ATP v buňkách. Při nízkém stavu energie nebo při anoxii jsou zásoby ATP vyčerpány a dochází k nahromadění volných fosfátů, které brání vazbě allosterických aktivátorů do allosterických míst a způsobují tak inhibici enzymu [62]. Při běžné hladině ATP a přítomnosti dalších příslušných aktivátorů dochází k allosterické aktivaci. Při vazbě allosterického aktivátoru dochází k uspořádání jinak neuspořádaného helixu A, což vede k sérii konformačních změn v oblasti aktivního místa včetně motivu III. Aktivní místo následně zaujme aktivní konformaci umožňující koordinačně navázat Mg^{2+} iont, který je nezbytný pro vazbu substrátu prostřednictvím fosfátu ve své molekule [57].

Poruchy allosterické regulace a změny v aktivitě cN-II jsou úzce spjaty s některými onemocněními. Zvýšenou aktivitu cN-II způsobuje Lesch-Nyhanův syndrom, jehož příčinou je deficit HGPRT (viz kapitoly 2.2.2 a 2.3.2). Tato dědičná porucha se projevuje hromaděním PRPP v buňkách a zvýšenou rychlostí *de novo* syntézy purinových nukleotidů. Tím vzniká velký nadbytek nukleotidů, které stimulují aktivitu cN-II, což následně vede k hyperurikémii a neurologickým dysfunkcím [63, 64]. Změny aktivity cN-II mohou být způsobeny také některými somatickými mutacemi v genu NT5C2. Zatímco některé mutace způsobují ztrátu katalytické aktivity (jako např. mutace D52N, která zasahuje do konzervovaného místa v motivu III, viz *Obrázek 9A*, str. 41, a poškozuje tak aktivní místo), jiné jsou aktivující a vedou k hyperaktivitě enzymu. Hyperaktivita cN-II se projevuje hyperurikémií, nicméně v průběhu několika posledních let bylo objeveno, že mnoho z těchto aktivujících mutací je příčinou relapsu akutní lymfoblastické leukemie.



Obrázek 9 – Struktura cN-II

(A) Tři ze čtyř vysoce konzervovaných motivů sdílených napříč všemi zástupci 5'-nukleotidas a enzymů HAD rodiny. Thr v motivu I (označeno červeně) může hrát významnou roli ve fosfotransferasové aktivitě, která byla pozorována pouze u cN-II a cN-III [61]. (B) Struktura monomeru cN-II je tvořena doménami "cap" (žlutě) a "core" (modře). Součástí "core" domény je tzv. helix a (tmavě modře), který je klíčový pro allosterickou regulaci aktivity cN-II. IMP se nachází v oblasti aktivního místa, 2,3-BPG pak v oblasti allosterického místa 1. (C) cN-II vytváří homotetramer, který je tvořen dvěma homodimery složenými ze dvou identických podjednotek (rozlišeno různými barvami). Rozhraní mezi dvěma podjednotkami homodimeru se nazývá jako rozhraní A, rozhraní držící oba homodimery pohromadě pak jako rozhraní B. Na obrázku jsou modře obarveny molekuly IMP navázané do aktivního místa každé podjednotky, oranžově jsou pak obarveny molekuly ATP a zeleně ionty Mg^{2+} , které jsou společně s ATP navázány do allosterického místa 1 každé podjednotky [57]. Obrázek byl upraven v programu Inkscape 0.92.1.

2.7 Akutní lymfoblastická leukemie

Akutní lymfoblastická leukemie (ALL) je závažné nádorové onemocnění způsobené maligní transformací lymfoidních progenitorových buněk. Vede k poruše krvetvorby bílých krvinek a postihuje pacienty v dospělém i dětském věku. Jedná se o nejběžnější nádorové onemocnění u dětí a ačkoliv jsou ve vyspělých zemích celkové šance na přežití u dětských pacientů vyšší než 85 %, výskyt relapsu je stále příliš častý a ve více než 60 % případů relapsu končí smrtí. Pro relaps bývá charakteristický vznik resistance buněk na léčebnou terapii [65, 66].

Léčebná terapie pacientů s ALL zahrnuje podání vysokých dávek kombinovaných chemoterapeutik. Ve více než 90 % případů se tímto postupem podaří docílit klinické a hematologické remise (vymizení příznaků a projevů onemocnění, nikoliv nemoci samé), která je obvykle následována "udržovací" terapií po dobu 2 let. Tato terapie je podstatně méně intenzivní a její podstatnou součástí je orální podávání klíčových léčiv 6-merkaptopurinu (6-MP) a 6-thioguaninu (6-TG) [67], které se řadí mezi purinové antimetabolity či jinak řečeno analogy purinových nukleotidů. Podstatou působení 6-MP a 6-TG je jejich konverze v buňkách působením HGPRT (viz kapitola 2.2.2) na 6-thioinosin monofosfát (TIMP), resp. na 6-thioguanosin monofosfát (TGMP). TIMP je aktivitou enzymů IMPDH a GMPS přeměněn také na TGMP, jehož molekuly jsou posléze přeměněny na cytotoxické (deoxy)-6-thioguanosin nukleotidy a začleněny do řetězců RNA a DNA. Tím vznikají poškozené a potenciálně letální molekuly DNA, které jsou následně v buňce rozpoznány a vedou k její programované buněčné smrti. Nádorové buňky mají v průběhu své nekontrolované proliferace vysokou spotřebu nukleotidů a je pro ně nejjednodušší je doplňovat resyntézou z extracelulárního prostoru. Díky tomu mohou přijímat podstatná množství 6-TG a 6-MP.

Vedle přímé inkorporace do DNA a RNA mohou být TIMP a TGMP přeměněny působením enzymu thiopurin methyltransferasou (TPMT) na cytotoxické sloučeniny methyl-TIMP (meTIMP) a methyl-TGMP (meTGMP). Principem cytotoxicity meTIMP je účinná inhibice enzymu PPAT, který katalyzuje první krok v *de novo* syntéze purinových nukleotidů (viz kapitola 2.2.3) [68].

Bylo pozorováno, že v průběhu udržovací terapie často dochází ke vzniku resistance nádorových buněk na 6-TG a 6-MP, což následně vede k relapsu ALL. Jednou z příčin

tohoto problému jsou mutace v genech pro cN-II nebo PRS-I. Na vznik resistance však tyto dva enzymy působí odlišnými mechanismy popsány níže.

2.7.1 Mechanismus relapsu způsobený mutacemi cN-II

cN-II katalyzuje hydrolytickou defosforylaci (deoxy)nukleosid monofosfátů za vzniku (deoxy)nukleosidů. Bylo pozorováno, že kromě svých přirozených substrátů je enzym schopen defosforylovat také analogy purinových nukleosid monofosfátů, tj. TGMP a TIMP. Při hyperaktivitě cN-II tímto mechanismem dochází k nežádoucí defosforylaci těchto analogů, což vede k jejich inaktivaci a neschopnosti účinně působit proti nádorovému onemocnění. Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.6.3, je hyperaktivita cN-II způsobena aktivujícími mutacemi v genu NT5C2. Dosud bylo popsáno několik somatických aktivujících mutací, které vznikly vždy specificky až v průběhu udržovací terapie a následně způsobily resistenci nádorových buněk vůči 6-MP a 6-TP, což vedlo k relapsu ALL. Mezi tyto mutanty cN-II patří varianty R238W, K359Q, R367Q, L375F, D407A, S408R, S445F a nesmyslná mutace Q523* [4, 65]. Teprve nedávno bylo objeveno, že tyto mutace způsobují změny na oligomerním rozhraní homotetrameru cN-II, čímž poškozují schopnost allosterické regulace enzymu a ústí v jeho hyperaktivitu [69]. Změny na oligomerním rozhraní vedou také ke zvýšené stabilitě oligomerního uspořádání a větší afinitě k substrátům.

2.7.2 Mechanismus relapsu způsobený mutacemi PRS-I

PRS-I katalyzuje reakci, při níž dochází ke vzniku PRPP z molekul R5P a ATP. Mutace v genu pro PRS-I způsobují buď hyperaktivitu enzymu, nebo ztrátu jeho katalytické aktivity a vedou k různým fenotypovým onemocněním, která byla popsána v kapitole 2.5.5. Byly však objeveny mutace, které způsobují relaps ALL a objevují se, podobně jako příslušné cN-II mutace, specificky v průběhu udržovací terapie. Mezi tyto PRS-I mutace specifické pro relaps ALL se řadí varianty S103I, S103N, S103T, N114D, N144S, G174E, K176N, D183E, A190T, L191F a T303S, které lze podle jejich lokalizace ve struktuře PRS-I rozdělit na dvě skupiny: mutace, jež se nachází na dimerním rozhraní, a mutace, jež se nachází na allosterických místech I a II. Do první jmenované skupiny patří N114D, G174E, K176N, D183E, A190T, L191F, destabilizují dimerní rozhraní a negativně ovlivňují schopnost enzymu vázat inhibitory ADP a GDP v allosterickém místě I.

Do druhé jmenované skupiny se řadí S103I, S103N, S103T, N144S a T303S a ovlivňují vazbu efektorů do allosterických míst I i II.

Ačkoliv se tedy mutace nacházejí buď na dimerním rozhraní, nebo v allosterických místech I a II, všechny způsobují sníženou schopnost allosterické regulace zpětnou vazbou prostřednictvím ADP a GDP, což vede ke zvýšení aktivity enzymu. Zvýšená aktivita PRS-I se projevuje zvýšením *de novo* syntézy purinových nukleotidů a následně nadbytkem molekul hypoxanthinu, které poté způsobují kompetitivní inhibici konverze inaktivního 6-MP na aktivní 6-TIMP prostřednictvím katalytické aktivity HGPRT. Tímto mechanismem tedy dochází ke vzniku resistance nádorových buněk vůči 6-MP [3].

3 Cíl práce

Tato práce je součástí projektu řešeného ve školící laboratoři, který je zaměřen na studium allosterické regulace cytosolické 5'-nukleotidasy II (cN-II) a jejích mutantních forem spojených s relapsem akutní lymfoblastické leukemie. Pochopení mechanismu allosterické regulace a jejích poruch je klíčové pro vývoj účinné terapeutické strategie proti tomuto onemocnění.

Cíle této bakalářské práce byly následující:

- literární problematika regulace metabolismu purinových nukleotidů se zaměřením na allosterickou regulaci enzymů PRS-I a cN-II
- exprese, izolace a purifikace zkrácené mutantní formy cN-II D52N+R238W (Δ 1-536)
- krystalizace zkrácené mutantní formy cN-II D52N+R238W(Δ 1-536) v komplexu se substrátem dGMP a aktivátorem dATP

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Bakteriální kmeny

Escherichia coli BL 21 (DE3) RIL

4.1.2 Plasmidy

Plasmid k expresi mutantní formy cN-II D52N+R238W byl připraven RNDr. Milanem Fábrym, CSc. na školícím pracovišti. Tento expresní konstrukt je odvozen z plasmidu pET28 kódujícího lidskou cN-II nukleotidasu, zkrácenou na C-konci (Δ 536–561), který byl zakoupen u Source Bioscience, UK. Mutace D52N a R238W byly postupně zavedeny ve vhodném fragmentu DNA s použitím protokolu QuikChange Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies) a tento úsek zpět vložen do štěpeného expresního plasmidu. Vektor je pod kontrolou indukovatelného T7 promotoru (pocházejícího z fága T7) a poskytuje rekombinantní cN-II obsahující na N-konci histidinovou kotvu (6×His) a štěpící místo pro thrombin (LeuValProArg||GlySer).

4.1.3 Chemikálie

agarosa	Bio-Rad, USA
akrylamid	Sigma-Aldrich, USA
bromfenolová modř	Sigma-Aldrich, USA
β -merkaptoethanol	Sigma-Aldrich, USA
dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát	Sigma-Aldrich, USA
dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, USA
dodecylsírán sodný (SDS)	Sigma-Aldrich, USA
dusičnan stříbrný	Sigma-Aldrich, USA
ethanol	Penta, Česká republika
ethylendiamin tetraoctová kyselina (EDTA)	Sigma-Aldrich, USA
isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Sigma-Aldrich, USA
formaldehyd	Sigma-Aldrich, USA
glukosa	Penta, Česká republika
glycerol	Penta, Česká republika
glycin	Sigma-Aldrich, USA
HEPES	Sigma-Aldrich, USA

hydroxid sodný	Penta, Česká republika
hydrogenfosforečnan sodný heptahydrát	Sigma-Aldrich, USA
chlorid sodný	Penta, Česká republika
imidazol	Fluka, Švýcarsko
kyselina chlorovodíková	Penta, Česká republika
kyselina octová	Penta, Česká republika
methanol	Penta, Česká republika
N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, USA
persíran amonný (APS)	Sigma-Aldrich, USA
Terrific Broth, modified	Sigma-Aldrich, USA
tris(2-karboxyethyl)fosfan (TCEP)	Sigma-Aldrich, USA
thiosíran sodný	Sigma-Aldrich, USA
tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich, USA
uhličitan sodný	Penta, Česká republika

4.1.4 Roztoky a média

AGAROVÉ PLOTNY:

35 mg/ml agar (Difco, USA); 20% (w/v) glukosa; 50 µg/ml kanamycin; 34 µg/ml chloramfenikol

TB (TERRIFIC BROTH) MÉDIUM:

47,6 mg/ml Terrific Broth; 0,008% (v/v) glycerol; 50 µg/ml kanamycin; 34 µg/ml chloramfenikol

LYZAČNÍ PUFR:

50mM HEPES, pH 7,5; 500mM NaCl; 10mM imidazol; 10% (v/v) glycerol; 0,5mM TCEP; EDTA-free PIC (Protease Inhibitor Cocktail; 1 tableta na 50 ml)

EKVILIBRAČNÍ PUFR PRO NIKLOVOU CHELATAČNÍ CHROMATOGRAPHII:

50mM HEPES, pH 7,5; 500mM NaCl; 10mM imidazol; 10% (v/v) glycerol; 0,5mM TCEP

ELUČNÍ PUFR PRO NIKLOVOU CHELATAČNÍ CHROMATOGRAPHII:

50mM HEPES, pH 7,5; 500mM NaCl; 500mM imidazol; 10% (v/v) glycerol; 0,5mM TCEP

VAZEBNÝ PUFR PRO IONTOVĚ VÝMĚNNOU CHROMATOGRAPHII:

50mM Na-fosfátový pufr pH 6,7; 100mM NaCl; 10% (v/v) glycerol; 2mM TCEP

ELUČNÍ PUFR PRO IONTOVĚ VÝMĚNNOU CHROMATOGRAFII:

50mM Na-fosfátový pufr pH 6,7; 1M NaCl; 10% (v/v) glycerol; 2mM TCEP

PUFR VHODNÝ PRO KRYSTALIZACI PROTEINU:

50mM Na-fosfátový pufr pH 6,7; 100mM NaCl; 2mM TCEP

PBS PUFR:

10mM hydrogenfosforečnan sodný; 1,8mM dihydrogenfosforečnan draselný; 136mM chlorid sodný; 2,6mM chlorid draselný; pH 7,2

Roztoky pro diskontinuální elektroforesu v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS**VZORKOVÝ PUFR (VP-S)**

125mM Tris (pH 6,8); 20% (v/v) glycerol; 0,1% (v/v) merkaptoethanol; 4% (w/v) SDS; 0,2% (w/v) bromfenolová modř

ELEKTRODOVÝ PUFR:

20mM Tris (pH 8,3); 200mM glycin; 0,1% (w/v) SDS

Roztoky pro přípravu polyakrylamidového gelu**ZÁSOBNÍ ROZTOK 40% AKRYLAMIDOVÉHO ČINIDLA (AA) – Sigma Aldrich, USA****DĚLÍCÍ GEL:**

12,5% (w/v) AA; 375mM Tris (pH 8,8); 1mM EDTA; 5% (v/v) glycerol; 0,1% (w/v) SDS; 0,1% (v/v) TEMED; 0,1% (w/v) persíran amonný

ZAOSTŘOVACÍ GEL:

5% (w/v) AA; 125mM Tris pH 8,8; 1mM EDTA; 5% (v/v) glycerol; 0,1% (w/v) SDS; 0,1% (v/v) TEMED; 0,1% (w/v) persíran amonný

Roztoky pro barvení gelu stříbrem

FIXAČNÍ ROZTOK:

12% (v/v) kyselina octová; 50% (v/v) methanol; 0,05% (v/v) formaldehyd

ROZTOK METHANOLU:

50% (v/v) methanol

ROZTOK $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$:

0,8mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

ROZTOK AgNO_3 :

12mM AgNO_3 ; 0,07% (v/v) formaldehyd

ROZTOK PRO VYVOLÁNÍ:

570mM Na_2CO_3 ; 0,05% (v/v) formaldehyd; 16 μ M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

ROZTOK PRO ZASTAVENÍ VYVOLÁNÍ:

12% (v/v) kyselina octová

50% (v/v) methanol

ROZTOK PRO UCHOVÁNÍ GELU:

50% (v/v) methanol

4.1.5 Chromatografické kolony

- HisTrapTM HP 5 ml (GE Healthcare)
- MonoS 5/50 GL 1 ml (GE Healthcare)

4.1.6 Ostatní materiál

- centrifugační filtry Amicon® Ultra 0.5mL, 4 mL, 15 mL (Merck Millipore, USA)
- celulosová dialyzační membrána, mezní velikost pórů 10 kDa (Sigma-Aldrich, USA)
- dialyzační jednotky Slide-A-Lyzer^(R) Mini Dialysis Unit 10 kDa (Thermo Fisher Scientific, USA)
- dialyzační rámečky Slide-A-Lyzer^(R) Dialysis Casette 10 kDa (Thermo Fisher Scientific, USA)

- standard molekulových hmotností pro SDS-PAGE Spectra™ Multicolor Broad range Protein Ladder 10–260 kDa (Thermo Fisher Scientific, USA)
- destička na krystalizaci INTELLI-PLATE® 96-2 Shallow Well (Art Robbins Instruments, USA) a EasyXtal Tool (Qiagen, USA)
- fólie na krystalizační destičky Greiner VIEWseal (Jena Bioscience, Německo)
- sada 96 precipitačních roztoků na krystalizaci Morpheus® (Molecular Dimensions, USA)

4.1.7 Přístroje a vybavení

centrifugy	Hettich Zentrifugen EBA 12R, rotor 1412, Německo Eppendorf Mini Spin, Německo Hermle Z 323 K, Německo Sorvall Instruments RC-3B, rotor H 4000, USA Heraeus Multifuge 3S-R Thermo Electron Corporation, Německo Beckman J-6M, rotor JLA 9.1000, JA-20, USA
spektrofotometry	Ultrospec 3100 <i>pro</i> UV/Visible Spectrophotometer Amersham Biosciences, Velká Británie NanoDrop ND-1000, USA
souprava na elektroforesu	Mighty Small™ II SE 250 Hoefer™ Scientific Instruments, USA zdroj Consort EV243, Belgie
rotační inkubátory	Gallenkamp (37 °C), Velká Británie Sanyo Orbital Incubator (20 °C), Japonsko
FPLC	Äkta Prime Amersham Bioscience, Švédsko Äkta FPLC (GE Healthcare, UK)
optické mikroskopy	Olympus SZX10, Japonsko
laminární box	BSB 4A Gelaire, Austrálie
vodní lázeň	Grant Instruments GD100 Series
suchá lázeň	Benchmark MyBlock™ mini dry bath, Benchmark Scientific, USA
váhy	Ohaus Adventurer Pro AV2102CM, USA
pH metr	GMH 3530 Griesinger Electronic, Německo

sonikátor	Dynatech (Farmingdale, NY, USA)
třepačka	Rotamax 120 Heidolph Instruments, Německo
magnetická míchačka	Jenway 1000, Velká Británie
Vortex	Stuart vortexmixer SA8 (Stuart Scientific, UK)
krystalizační robot	Crystal Gryphon (Art Robbins Instruments, USA)
	Oryx 8 (Douglas Instruments, UK)

4.2 Metody

Exprese v E. coli, purifikace a krystalizace

4.2.1 Rekombinantní exprese proteinu

Zkrácená mutantní forma (His)₆-cN-II D52N+R238W(Δ 1-536) byla exprimována v kmenu *Escherichia coli* BL21 (DE3) RIL. Do 100 μ l suspenze těchto kompetentních bakteriálních buněk byl pipetován 1 μ l roztoku expresního plasmidu (4.1.2). Takto upravená buněčná suspenze byla držena na ledu po dobu 30 min a poté přenesena na 45 s do vodní lázně vytemperované na 42 °C. Tím byly buňky vystaveny teplotnímu šoku, který umožnil jejich transformaci expresním plasmidem. Z vodní lázně byla buněčná suspenze umístěna na 2 min na led. Následně bylo suspenzí inokulováno 900 μ l LB média (4.1.4) a ponecháno po dobu 1 h třepat při 200 RPM v inkubátoru TCH 100 při 37 °C. Po inkubaci bylo 300 μ l tohoto roztoku buněčné suspenze rozetřeno na velkou agarovou plotnu (průměr 15 cm, 150 ml roztoku agaru) obsahující chloramfenikol a kanamycin a plotna ponechána v inkubátoru přes noc při 37 °C.

Následující den byly přes noc narostlé kolonie z plotny smyty 15 ml roztoku TB média (4.1.4). Při vlnové délce $\lambda = 600$ nm byla na spektrofotometru Ultrospec 3100*pro* změřena optická densita (OD₆₀₀) vzniklé buněčné suspenze. Suspenzí bylo následně inokulováno 4 \times 500 ml TB média ve 2l Erlenmeyerových baňkách tak, aby počáteční OD₆₀₀ buněk v TB médiu odpovídala hodnotě cca 0,1. TB médium bylo v baňkách před inokulací vytemperováno na 37 °C v rotačním inkubátoru Gallenkamp. Zde byla po inokulaci zahájena kultivace buněčné kultury při 200 RPM a 37 °C. Po dosažení hodnoty OD₆₀₀ přibližně 0,9 byly baňky s buněčnou kulturou přeneseny do rotačního inkubátoru Sanyo, jenž byl předem vytemperován na 18 °C, a při 200 RPM ponechány na tuto teplotu vytemperovat. Následně byla provedena indukce exprese – do každé baňky byl pipetován

roztok IPTG (4.1.4) tak, aby jeho koncentrace v kultivačním médiu byla 0,5mM. Kultivace poté probíhala přes noc.

Další den byla kultivace ukončena při poklesu hodnoty OD₆₀₀ buněčné kultury. Baňky s buněčnou kulturou byly vyjmuty z rotačního inkubátoru a přelity do dvou 1l centrifugačních nádob. Následně byla buněčná kultura centrifugována v předem předchlazené centrifuze Beckman JLA-21M (5000 RCF/min, 4 °C, 20 min, rotor JLA 9.1000). Vzniklý sediment buněčné biomasy byl na ledu resuspendován v PBS pufru (4.1.4) a rozdělen do čtyř 35ml centrifugačních nádob. V těchto nádobách byla suspenze buněčné biomasy centrifugována v předem předchlazené centrifuze Beckman J-21M (10000 RCF/min, 4 °C, 20 min, rotor JA-20). Jedna peleta byla zamražena a uchována při – 80 °C.

4.2.2 Purifikace proteinu

Pelety ve třech 35ml centrifugačních nádobách byly na ledu resuspendovány v 250 ml lyzačního pufru (4.1.4). Následně byla tato suspenze rozdělena na 2 × 125 ml a na ledu homogenizována sonikátorem Dynatech. Vzniklý buněčný lyzát byl centrifugován v předem předchlazené centrifuze Beckman J-21M (20000 RCF/min, 4 °C, 30 min, rotor JA-20). Supernatanty buněčného lyzátu byly spojeny do 500ml Erlenmeyerovy baňky a drženy na ledu.

4.2.3 Chelatační chromatografie

V prvním purifikačním kroku byl supernatant buněčného lyzátu podroben niklové chelatační chromatografii. Kolona HisTrapTM HP (4.1.5) byla nejprve ekvilibrována ekvilibračním pufrem pro niklovou chelatační chromatografii obsahujícím 10mM imidazol (4.1.4) při průtoku 5 ml/min. Následně na ni byl nanesen supernatant buněčného lyzátu při průtoku 1 ml/min. Po nanesení byla při průtoku 2 ml/min kolona promyta ekvilibračním pufrem obsahujícím 10mM imidazol a následně tím samym pufrem s 3% podílem elučního pufru pro niklovou chelatační chromatografii obsahujícím 500mM imidazol, tj. roztok obsahující 25mM imidazol (4.1.4). Poté byla při průtoku 2 ml/min provedena eluce pomocí směsi ekvilibračního pufru s 10mM imidazolem a elučního pufru s 500mM imidazolem s lineárním gradientem elučního pufru z 3 % (25mM imidazol) na 100 % (500 mM imidazol) v objemu 60 ml. Při eluci byly jímány frakce o objemu 2 ml.

Frakce byly analyzovány pomocí diskontinuální elektroforesy v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS s následnou detekcí stříbrem (4.2.7). Na základě této analýzy byly vybrány a spojeny frakce obsahující protein (viz kapitola 5.2) a dialýzou (4.2.5) převedeny do ekvilibračního pufru pro iontově výměnnou chromatografii (4.1.4).

4.2.4 Ionově výměnná chromatografie

Ve druhém purifikačním kroku byl roztok proteinu podroben iontově výměnné chromatografii na MonoS 5/50 GL koloně (katex) (4.1.4). Kolona byla při průtoku 1 ml/min ekvilibrována ekvilibračním pufrem pro iontově výměnnou chromatografii obsahujícím 100mM NaCl (4.1.4). Poté na ni byl nanesen proteinový preparát při průtoku 1 ml/min. Eluce proběhla v následující sekvenci: 25 objemů kolony s gradientem elučního pufru pro iontově výměnnou chromatografii obsahujícím 1M NaCl (4.1.4) z 0 % na 50 %, poté 5 objemů kolony s gradientem stejného elučního pufru z 50 % na 100 % a nakonec promývání 5 objemy kolony 100% elučním pufrem pro iontově výměnnou chromatografii. Objem jímáných frakcí byl 2 ml.

Frakce byly analyzovány pomocí diskontinuální elektroforesy v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS s následnou detekcí stříbrem (4.2.7). Následně byly vybrané frakce spojeny (viz kapitola) a dialýzou (4.2.5) převedeny do pufru vhodného pro krystalizaci proteinu (4.1.4).

4.2.5 Dialýza

Za účelem převedení proteinových roztoků do vhodného pufru byla použita dialýza při 4 °C za stálého míchání dialyzátu. Větší objemy (> 15 ml) proteinového roztoku byly dialyzovány v celulosové dialyzační membráně s mezní velikostí pórů 12,5 kDa, menší objemy (< 15 ml) pak v dialyzačních rámečcích Slide-A-Lyzer™ s mezní velikostí pórů 10 kDa. Po dialýze byl filtrát vždy centrifugován v centrifuze Hettich EBA 12 R (10000 RCF/min, 4 °C, 10 min) kvůli jeho oddělení od proteinových precipitátů.

4.2.6 Zahuštění

K zahuštění roztoku vypurifikovaného proteinu byla využita centrifugace pomocí centrifugačních filtrů Amicon® Ultra 0.5mL, 4,0 mL a 15 mL o mezní velikosti pórů 10 kDa. Zahušťování většího objemu bylo prováděno na centrifuze Hermle Z 323 K

(5000 RCF/min, 4 °C), menšího objemu pak na centrifuze Hettich EBA 12 R (10000 RCF/min, 4 °C).

4.2.7 Stanovení koncentrace proteinu měřením absorbance

Absorbance roztoků proteinů byla měřena při pokojové teplotě na přístroji NanoDrop ND-1000 při vlnové délce $\lambda = 280$ nm. Pro výpočet hodnot koncentrace byl použit absorpční koeficient konstruktu (His)₆-cN-II D52N+R238W(Δ 1-536), který má při této vlnové délce hodnotu $1,157 \text{ ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Tato hodnota je teoretická a byla vypočítána programem ExPASy - ProtParam Tool [70].

4.2.8 Diskontinuální elektroforesa v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS

Diskontinuální elektroforesa v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (SDS-PAGE) byla provedena ve vertikálním tris-glycinovém uspořádání na aparatuře Mighty Small II SE 250. Zaostřovací gel obsahoval 5% (w/v) akrylamid (AA), dělicí gel pak 12,5% (w/v) AA (4.1.4). Vzorky proteinů byly nejprve zředěny tak, aby množství proteinu v objemu 10 μl nepřesahovalo hodnotu 5 μg . K 10 μl naředěných vzorků bylo následně pipetováno 5 μl VP-S (4.1.4), vzorky přivedeny k varu v suchém inkubátoru MyBlockTM mini a poté krátce centrifugovány na centrifuze Eppendorf MiniSpin (13 400 RCF/min, laboratorní teplota, cca 15 s). Do první jamky zaostřovacího gelu bylo nanášeno 5 μl standardu molekulových hmotností pro SDS-PAGE (4.1.6), do dalších jamek bylo nanášeno vždy 12,5 μl připravených vzorků. Poté byla při počátečním napětí zdroje 100 V zahájena elektroforetická separace. Jakmile linie modrých proužků (bromfenolová modř, jež byla součástí VP-S) doputovala na rozhraní mezi zaostřovacím a dělicím gelem, bylo napětí zdroje zvýšeno na 180 V. Elektroforéza byla ukončena ve chvíli, kdy linie modrých proužků doputovala ke kladnému pólu na dolním okraji gelu.

Barvení stříbrem

Po ukončení elektroforesy byl gel barven stříbrem. V průběhu procesu byla využívána třepačka Rotamax 120, složení používaných roztoků je uvedeno v kapitole 4.1.4. Nejprve byl gel fixován ve fixačním roztoku po dobu 45 min. Poté byl celkem třikrát promyt 50% (v/v) roztokem methanolu po dobu 5, 10 a 15 min a následně vložen na 20 s do roztoku Na₂S₂O₃. Po uplynutí 20 s následovalo opláchnutí gelu deionizovanou vodou

a promývání v roztoku AgNO_3 po dobu 20 min. Po promývání byl gel opláchnut v deionizované vodě a vyvoláván v roztoku pro vyvolání. Vyvolávání gelu bylo zastaveno jeho přenesením do roztoku pro zastavení vyvolávání. Obarvený gel byl uložen do uchovávacího 50% (v/v) roztoku methanolu.

Sušení gelu

Gel uložený v 50% (v/v) roztoku methanolu byl za účelem jeho archivace máčen v roztoku 20% (v/v) ethanolu a 3% (v/v) glycerolu a následně vysušen na napnuté celofánové fólii.

4.2.9 Krystalizace metodou difuzí par

Krystalizace rekombinantního proteinu $(\text{His})_6\text{-cN-II D52N+R238W}(\Delta 1\text{-536})$ (4.1.2) byla provedena metodou difúzí par v sedící kapce (*angl.* sitting drop). Roztok čistého rekombinantního proteinu o koncentraci 8 mg/ml byl nejprve smíchán s následujícími ligandy na výslednou koncentraci 10mM dATP, 10 mM dGMP a 20 mM MgCl_2 . Pomocí krystalizačního robota Crystal Gryphon byla 2 × 96jamkovou destičku INTELLI-PLATE® 96-2 Shallow Well aplikována komerční sada precipitačních roztoků Morpheus® (96 precipitačních podmínek). Do zásobních rezervoárů pipetoval robot vždy 50 μl precipitačního roztoku. Kapičky roztoku proteinu s ligandy o objemu 300 nl byly na destičku nasazeny za pomoci krystalizačního robota Oryx 8 a roztok rekombinantního proteinu v jamkách byl s precipitačním roztokem smíchán vždy v poměru 1:2 na jednu jamku a 2:1 na druhou jamku u každé podmínky. Poté byla destička přelepena fólií na krystalizační destičky a uložena do zařízení pro automatické monitorování krystalizačních experimentů (RIGAKU CrystalMation Gallery DT), v němž byl průběh krystalizace v jednotlivých jamkách monitorován v pravidelných časových intervalech ve viditelném a UV světle.

5 Výsledky

5.1 Heterologní exprese rekombinantního proteinu

Kultivací buněčné kultury *Escherichia coli* BL21 (DE3) RIL v TB médiu jsme ze 2 l kultivačního média získali 32 g buněčné biomasy, z níž bylo 24 g použito k purifikaci rekombinantního proteinu (4.2.2). Postup přípravy neaktivní mutantní varianty (His)₆-cN-II D52N+R238W(Δ 1-536) byl odvozen od postupu přípravy aktivní varianty cN-II. Rekombinantní produkt se nacházel zejména v cytosolu bakteriálních buněk a z této rozpustné frakce byl také následně purifikován. Výsledný rekombinantní produkt je protein o velikosti 555 aminokyselinových zbytků (Obrázek 10), který na N-konci obsahuje histidinovou kotvu (6×His) a štěpící místo pro thrombin (LeuValProArg||GlySer). Vlastní sekvence cN-II je dlouhá 536 aminokyselinových zbytků a končí zbytkem na pozici 536. Na C-konci je protein zkrácený o úsek 25aminokyselinových zbytků. Tento úsek podle předchozích studií snižoval proteinovou stabilitu a znemožňoval úspěšnou krystalizaci [61]. N-koncová histidinová kotva nebyla z rekombinantního produktu odštěpena, neboť nebrání krystalizaci a neovlivňuje aktivitu enzymu, jak již bylo dříve ověřeno pro aktivní formu cN-II.

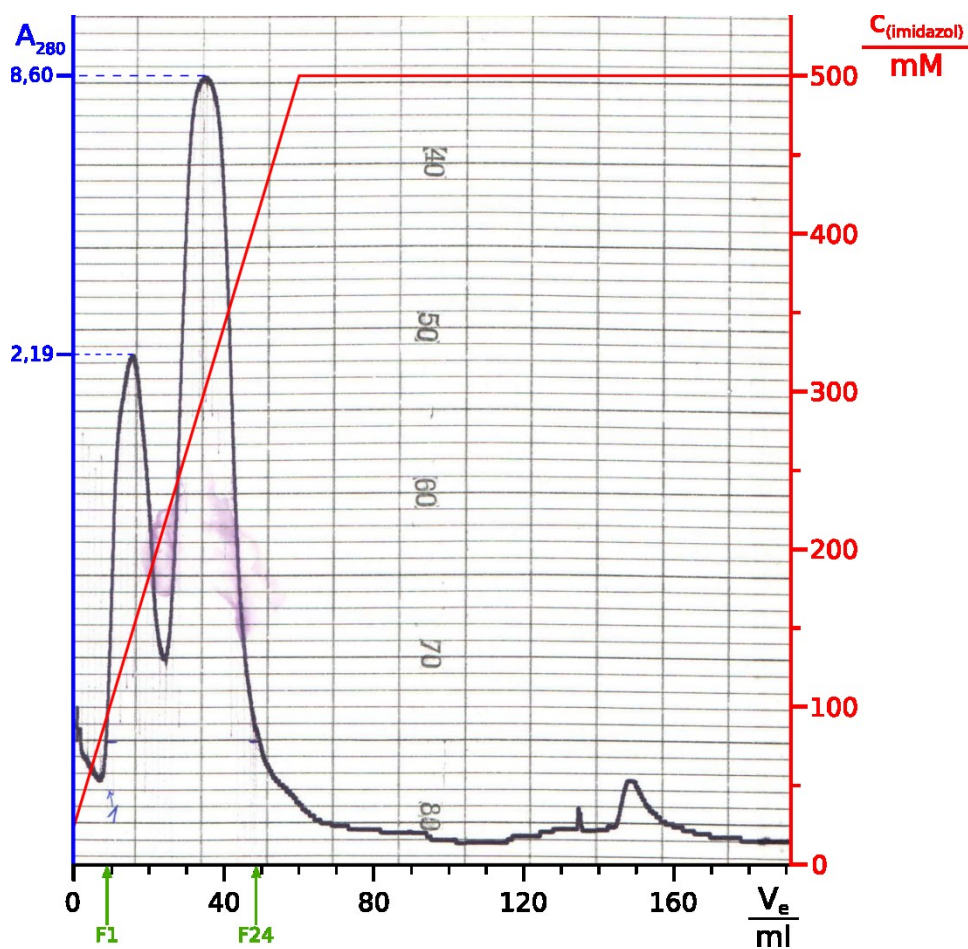
1	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSM	↓	STSWSDRLQNAADMPANMDKHALKKYRREAYHRVFNRS	60
61	AMEKIKCFGFNM		MDYTLAVYKSPEYESLGFE	120
131	FDTLYGNLLKVDAYGNLLVCAHG		FNFI	180
181	TYLLACLVDFF		TNCPRYTSCETGFKDGLFMSYRSMFQDVRDAVDWVHYKGS	240
241	LEKYVVKDGKLP		LLLSWMKEVGKVFLATNSDYKYTDKIMTYLFD	300
301	YFDLILVDARKPLFFGEGTVLRQV		DTKTGKLKIGTYTGPLQHGIVYSGGSSDTICDLLGA	360
361	KGKDILYIGDHIFGDILKSKRQGW		R	420
421	LYKHL		DSSSNERPDISSIQRRIKKVTHDMDCMCYGMMGSLFRSGSRQTLFASQVMRYADLY	480
481	AASFINLLYYPFSYLFRAAHV		MLPHESTVEH	540
541	QLTRSISEIKPPN		IT	555

Obrázek 10 – Aminokyselinová sekvence rekombinantního produktu

Vlastní sekvence cN-II D52N+R238W(Δ 1-536) je dlouhá 536 aminokyselinových zbytků, její začátek a konec je vyznačen červeně. Černě jsou v této sekvenci vyznačeny mutace D52N a R238W. Žlutě je vyznačena sekvence obsahující histidinovou kotvu (6×His). Sekvence histidinové kotvy a vlastní sekvence cN-II D52N+R238W(Δ 1-536) je propojena štěpícím místem pro thrombin (vyznačeno zeleně), přičemž místo štěpení thrombinem je naznačeno šipkou.

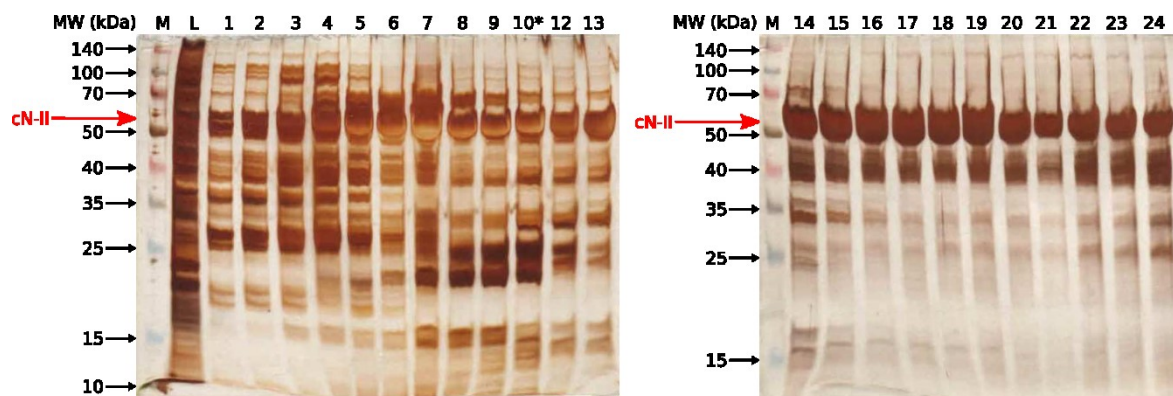
5.2 Purifikace rekombinantního proteinu

Heterologní expresí byl připraven rekombinantní produkt, který obsahoval histidinovou kotvu (6×His). Tato kotva dovolila velmi účinnou purifikaci již v prvním kroku, kterým byla chelatační chromatografie na koloně HisTrapTM HP. Průběh purifikace byl monitorován pomocí SDS-PAGE (*Obrázek 12*, str. 58) (4.2.8). Rekombinantní protein se velmi dobře navázal na kolonu a byl eluován v přítomnosti 25-500mM imidazolu ve 24 frakcích o objemu 2 ml (*Obrázek 11*, str. 58) (4.2.3). Protein o velikosti 64 kDa byl přítomen ve všech frakcích, pro další purifikaci jsme použili frakce 13-24. Spojením frakcí jsme získali proteinový roztok o objemu 24 ml a koncentraci 3,8 mg/ml proteinů (cca 91 mg proteinů), který byl poté dialýzou (4.2.5) převeden do ekvilibračního pufru pro iontově výměnnou chromatografii (4.1.4). Při dialýze zprecipitovala přibližně třetina množství proteinů a po následné centrifugaci filtrátu jsme získali přibližně 30 ml proteinového roztoku o koncentraci 2 mg/ml proteinů (cca 60 mg proteinů).



Obrázek 11 – Chromatogram zachycující průběh eluce při chelatační chromatografii na niklové koloně HisTrapTM HP 5ml (GE Healthcare).

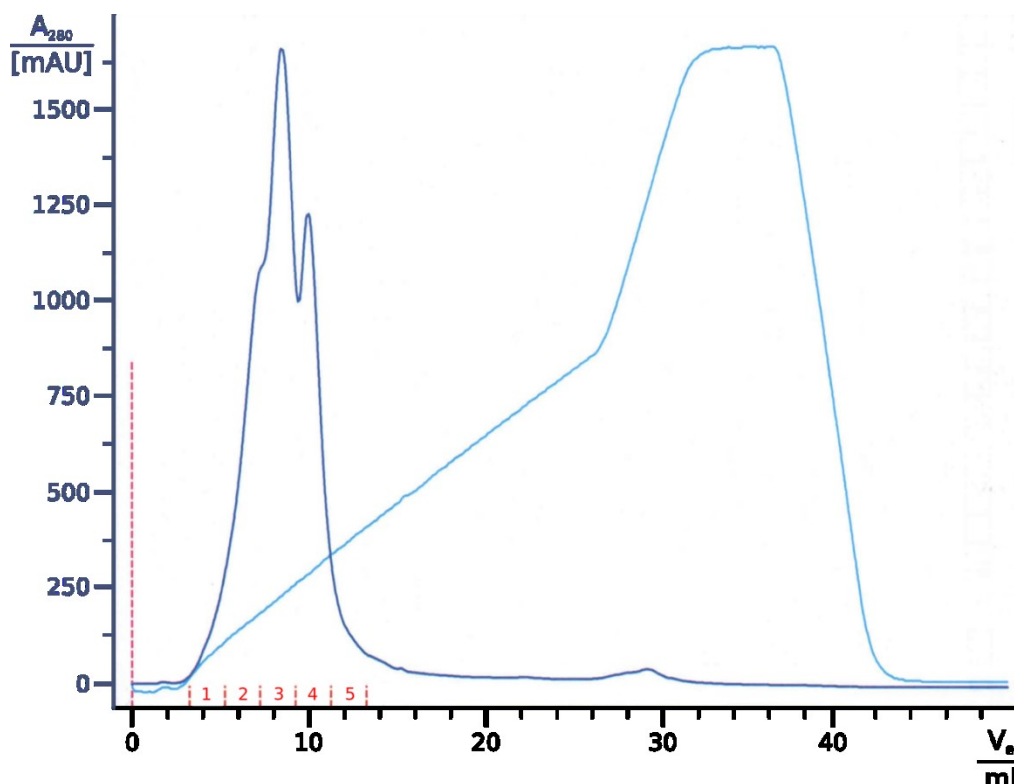
Eluce probíhala při konstantním průtoku 2 ml/min. Během eluce bylo jímáno celkem 24 frakcí o objemu přibližně 2 ml. Na chromatogramu je vyznačen eluční objem 1. a 24. frakce (F1 a F24, zelená); zbylé frakce 2-23 byly jímány v elučním objemu mezi 1. a 24. frakcí. Černá křivka znázorňuje průběh relativní absorpance eluátu, který byl sledován chromatografickou stanicí ÄKTA Prime (Amersham Bioscience, Švédsko). Červená křivka znázorňuje průběh gradientu imidazolu v elučním pufru. Obrázek byl upraven v programu Inkscape 0.92.1.



Obrázek 12 – Analýza frakcí po chelatační chromatografii na niklové koloně HisTrapTM HP 5ml (GE Healthcare)

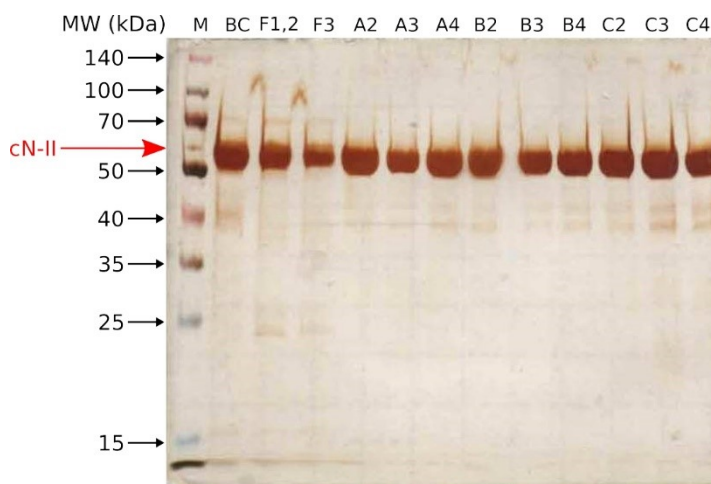
Polyakrylamidové gely obarvené stříbrem (4.2.8), na jejichž základě byly pro další purifikační krok vybrány frakce 13-24. Vysvětlení zkratk: M – standard molekulových hmotností SpectraTM Multicolor Broad range Protein Ladder; MW – molekulové hmotnosti v jednotkách kDa přiřazené k příslušným proužkům standardu; L – vzorek buněčného lyzátu; 1-24 – vzorky frakcí 1-24, 10* – spojené frakce 10 a 11. Obrázek byl upraven v programu Inkscape 0.92.1.

Dalším purifikačním krokem byla iontově výměnná chromatografie na koloně MonoS 5/50 GL ve třech dávkách. Protein byl na kolonu navázán při pH 6,7, které je pod hodnotou teoretického isoelektrického bodu vypočítanou z primární sekvence (*Obrázek 10*, str. 56, hodnota pI 7,68) [70]. Eluce byla prováděna gradientem koncentrace NaCl v rozmezí 10mM až 1M. Reprezentativní eluční profil je ukázán na *Obrázek 13* (chromatogramy 2. a 3. separace byly téměř totožné). Vybrali jsme frakce vykazující nejvyšší signál absorpance při vlnové délce $\lambda = 280$ nm, tj. frakce 2-4. Stejným způsobem jsme vybrali frakce ze všech 3 chromatografických separací. Celkem jsme tedy získali 9 frakcí a ty následně testovali na přítomnost cN-II pomocí SDS-PAGE (4.2.8; *Obrázek 14*, str. 60). Všechny frakce obsahovaly cN-II, tudíž jsme je sloučili a získali tak 18 ml čistého roztoku rekombinantního proteinu o koncentraci 0,9 mg/ml (cca 16 mg proteinu). Tento roztok byl poté dialýzou (4.2.5) převeden do pufru vhodného pro krystalizaci proteinu (50mM Na₂HPO₄; 50mM NaH₂PO₄; 100mM NaCl; 2mM TCEP; pH 6,7) a zahuštěn na koncentraci 8 mg/ml.



Obrázek 13 – Chromatogram zachycující průběh iontově výměnné chromatografie na katexové koloně MonoS 5/50 GL 1 ml (GE Healthcare)

Tmavě modrá křivka grafu vyjadřuje změny absorpance eluátu v průběhu eluce, světle modrá křivka zachycuje průběh zvyšujícího se gradientu NaCl – v minimu křivky je hodnota koncentrace NaCl 10mM, v maximu pak 1M. Červená čárkovaná čára označuje zahájení eluce, červená čísla 1-5 vyjadřují jímání frakce 1-5 o objemu přibližně 2 ml. Z těchto frakcí byly pro další zpracování vybrány frakce 2-4. Vysvětlení zkratk: V_e – eluční objem. Obrázek byl upraven v programu Inkscape 0.92.1.



Obrázek 14 – Analýza vybraných frakcí po iontové výměnné chromatografii na katexové koloně MonoS 5/50 GL 1 ml (GE Healthcare)

Polyakrylamidový gel obarvený stříbrem (4.2.7), Vysvětlení zkratk: M – standard molekulových hmotností Spectra™ Multicolor Broad range Protein Ladder; BC – vzorek proteinového roztoku před chromatografickou separací; F1,2 a F3 – vzorky roztoku proteklého kolonou při nanášení (F1,2 pro 1. a 2. separaci, F3 pro 3. separaci); A/B/C2-4 – vzorky jímáných frakcí. Obrázek byl upraven v programu Inkscape 0.92.1.

Dvoustupňovou purifikaci jsme získali celkem 0,5 ml roztoku proteinu o koncentraci 8 mg/ml (cca 4 mg proteinu), který byl rozdělen do 20 alikvotů o objemu 25 μ l. Alikvoty byly poté zamrazeny a uchovány při teplotě – 80°C. *Tabulka 5* shrnuje průběh celé purifikace.

Tabulka 5 – Průběh purifikace cN-II

Purifikaci se podařilo získat 4 mg rekombinantního proteinu. Vysvětlení zkratk: HisTrap – chelatační chromatografie na niklové koloně HisTrap™ HP; MonoS – iontově výměnná chromatografie na katexové koloně MonoS 5/50 GL

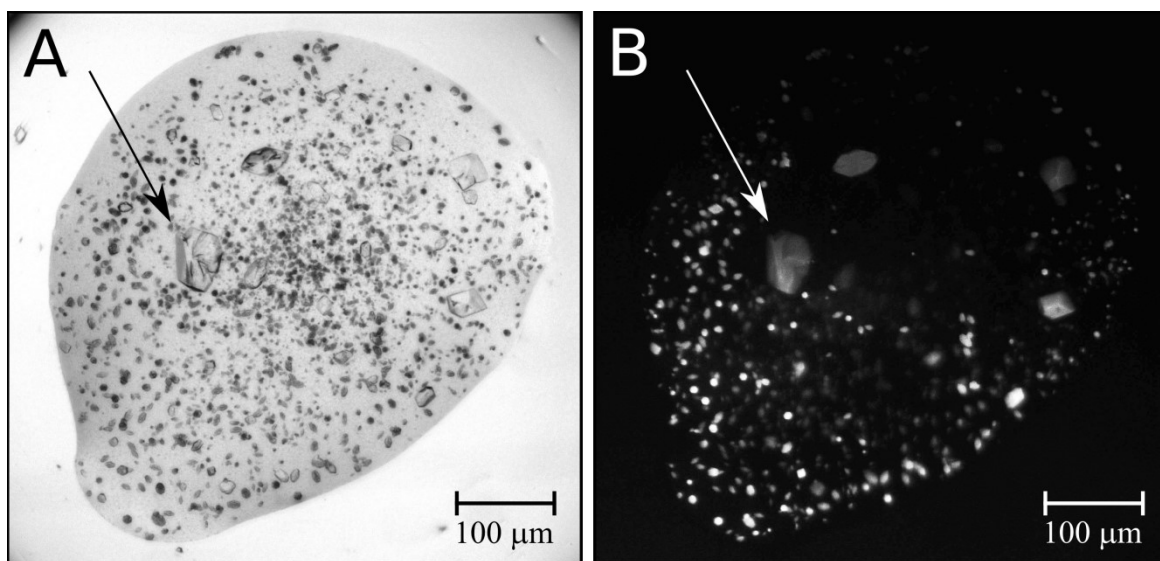
Fáze purifikace proteinu	Koncentrace proteinů [mg/ml]	Objem [ml]	Množství proteinů [mg]
Spojené frakce po HisTrap	3,8	24	91,2
Proteinový roztok před MonoS	1,9	30	56,4
Spojené frakce po MonoS	0,9	18	31,7
Roztok čistého proteinu	8,1	0,5	4,0

5.3 Příprava proteinových krystalů pro difrakční analýzu

Pro krystalizační experimenty byly k rekombinantnímu proteinu přidány substrát (dGMP), aktivátor (dATP) a též chlorid hořečnatý, jenž je nezbytný pro vazbu substrátu.

Pro hledání krystalizačních podmínek (tzv. krystalizační „screening“) byly vybrány roztoky komerční sady Morpheus®. Krystaly vhodné pro difrakční analýzu byly získány již z tohoto experimentu a podmínky krystalizace nemusely být dále optimalizovány. Při krystalizaci metodou difúzí par (4.2.9) se první malé krystaly objevily v několika

experimentech po 4 dnech, krystaly dosáhly rozměrů vhodných pro sběr dat po 10 dnech. *Obrázek 15*, zachycuje jamku H11.1 v 10. dni od nasazení krystalizačního experimentu. Složení kapky a krystalizační podmínky byly následující: vzorek cN-II o koncentraci 8 mg/ml; 10mM dATP; 10mM dGMP; 20mM MgCl₂; 50mM pufr citrátu sodného v kyselině citronové, pH 6; 2mM TCEP; 0,1M MD Morpheus Aminoacid Mix; 30% (v/v) MD Morpheus GOL_P4K Mix; 0,1M MD Morpheus Buffer System 3, pH 8,5; teplota 18 °C. Krystal o velikosti 50×50×40 μm byl uchycen do nylonové smyčky, zchlazen v tekutém dusíku a uchován pro difrakční experiment na zdroji synchrotronového záření.



Obrázek 15 – Kapka s krystaly rekombinantního proteinu (His)₆-cN-II D52N+R238W(Δ1-536) v jamce H11.1 v 10. dni od nasazení

(A) Fotografie kapky ve viditelné oblasti světelného spektra. Na obrázku je několik větších proteinových krystalů. (B) Fotografie kapky v UV oblasti světelného spektra. Šedé až bílé krystaly a precipitáty jsou tvořeny rekombinantním proteinem. Krystal označený šipkou na obou obrázcích byl v 10. dni od nasazení podmínek uchycen do nylonové smyčky a uložen do tekutého dusíku pro následné difrakční měření. Obrázky byly upraveny v programu Inkscape 0.92.1, jas a kontrast obrázků byl upraven v programu Microsoft Office Picture Manager.

6 Diskuse

V této studii byl připraven rekombinantní protein, neaktivní mutantní varianta lidského enzymu cN-II zkráceného o 25aminokyselinový úsek na svém C-konci. Tento úsek podle předchozích studií snižoval proteinovou stabilitu a znemožňoval úspěšnou krystalizaci [61].

Úspěšně jsme připravili roztok zkrácené mutantní varianty (His)₆-cN-II D52N+R238W(Δ 1-536) určené pro krystalizaci a následné strukturní studie. Rekombinantní protein zkrácené varianty byl připraven podle zavedeného protokolu (postup je popsán v kapitolách 4.2.1-4.2.9). Výtěžek z 1 l buněčné kultury byl 2,7 mg čistého rekombinantního proteinu. Ke ztrátám proteinu (*Tabulka 5*, str. 60) došlo zejména při dialýzách, při nichž část proteinu precipitovala. K nejvýraznějším ztrátám proteinu dále došlo při zahušťování čistého proteinového roztoku. I přes tyto ztráty jsme získali celkové množství 4 mg z 1,5 l kultury. Výtěžek je srovnatelný s výtěžky aktivní formy cN-II dosažené ve školící laboratoři i na jiných pracovištích [61]. Mutace nijak negativně neovlivnily výtěžek a díky získání proteinu v dostatečném množství a kvalitě jsme mohli přistoupit ke strukturním studiím a tedy ke krystalizaci proteinu, která byla jedním z cílů této bakalářské práce.

Krystalizace rekombinantního proteinu byla provedena podle zavedených postupů pro cN-II [61, 69]. Metodou difuzí par v sedící kapce jsme získali kvalitní a dostatečně velké proteinové krystaly přímo z prvního krystalizačního screeningu, podmínky krystalizace proto nebylo třeba dále optimalizovat. Krystal cN-II o velikosti 50×50×40 μ m získaný z roztoku o složení: vzorek cN-II o koncentraci 8 mg/ml; 10mM dATP; 10mM dGMP; 20mM MgCl₂; 50mM pufr citrátu sodného v kyselině citronové, pH 6; 2mM TCEP; 0,1M MD Morpheus Aminoacid Mix; 30% (v/v) MD Morpheus GOL_P4K Mix; 0,1M MD Morpheus Buffer System 3, pH 8,5 a při teplotě 18 °C byl vhodný pro difrakční analýzu. Z tohoto krystalu byla pomocí rentgenové difrakce (RTG-difrakce, *angl.* X-ray diffraction) na synchrotronu BESY II (Helmholz-Zentrum, Berlín) nasnímána difrakční data s rozlišením 1,7 Å. Strukturní analýza metodou rentgenové difrakce byla provedena kolegy ve školící laboratoři a není součástí této práce.

7 Závěr

V literární rešerši byly shrnuty současné informace o problematice metabolismu purinových nukleotidů, zejména jeho regulace prostřednictvím allosterické regulace a formování multienzymových komplexů. Podrobněji byly popsány vlastnosti enzymů PRS-I a cN-II, které hrají důležitou roli v regulaci a poruchách purinového metabolismu. Tyto poruchy bývají příčinou mnoha onemocnění včetně hyperurikémie, hyperurikosurie, percepční nedoslýchavosti, choroby Charcot-Marie-Tooth, Artsova syndromu a akutní lymfoblastické leukemie.

V experimentální části byla úspěšně provedena rekombinantní exprese, purifikace a krystalizace zkrácené neaktivní mutantní varianty (His)₆-cN-II D52N+R238W(Δ 1-536). Dvoustupňovou purifikací pomocí chelatační chromatografie a iontově výměnné chromatografie bylo získáno přibližně 4 mg proteinu. Množství a čistota získaného proteinu byly dostatečné pro následnou krystalizaci, jež byla provedena metodou difúzí par v sedící kapce. Pro krystalizaci byla použita komerční sada 96 precipitačních podmínek Morpheus[®] (Molecular Dimensions, USA) a podařilo se získat dostatečně velký proteinový krystal vhodný pro sběr difrakčních dat.

8 Seznam použité literatury

1. Nyhan, W.L.: Disorders of purine and pyrimidine metabolism. *Mol Genet Metab*, 2005. **86**(1-2): p. 25-33.
2. Pedley, A.M. and S.J. Benkovic: A New View into the Regulation of Purine Metabolism: The Purinosome. *Trends in Biochemical Sciences*. **42**(2): p. 141-154.
3. Li, B., et al.: Negative feedback-defective PRPS1 mutants drive thiopurine resistance in relapsed childhood ALL. *Nat Med*, 2015. **21**(6): p. 563-71.
4. Meyer, J.A., et al.: Relapse-specific mutations in NT5C2 in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*, 2013. **45**(3): p. 290-4.
5. Zhao, H., et al.: The purinosome, a multi-protein complex involved in the de novo biosynthesis of purines in humans. *Chem Commun (Camb)*, 2013. **49**(40): p. 4444-52.
6. Lane, A.N. and T.W. Fan: Regulation of mammalian nucleotide metabolism and biosynthesis. *Nucleic Acids Res*, 2015. **43**(4): p. 2466-85.
7. Chitrakar, I., et al.: Higher order structures in purine and pyrimidine metabolism. *J Struct Biol*, 2017.
8. Schubot, F.D., et al.: Crystal structure of the protease-resistant core domain of Yersinia pestis virulence factor YopR. *Protein Sci*, 2005. **14**(6): p. 1679-83.
9. Vogels, G.D. and C. Van der Drift: Degradation of purines and pyrimidines by microorganisms. *Bacteriol Rev*, 1976. **40**(2): p. 403-68.
10. Gutman, A.B.: Significance of uric acid as a nitrogenous waste in vertebrate evolution. *Arthritis & Rheumatism*, 1965. **8**(4): p. 614-626.
11. Fox, I.H.: Metabolic basis for disorders of purine nucleotide degradation. *Metabolism*, 1981. **30**(6): p. 616-34.
12. Maiuolo, J., et al.: Regulation of uric acid metabolism and excretion. *Int J Cardiol*, 2016. **213**: p. 8-14.
13. Harris, C.M. and V. Massey: The Reaction of Reduced Xanthine Dehydrogenase with Molecular Oxygen: REACTION KINETICS AND MEASUREMENT OF SUPEROXIDE RADICAL. *Journal of Biological Chemistry*, 1997. **272**(13): p. 8370-8379.
14. Fujiwara, S. and T. Noguchi: Degradation of purines: only ureidoglycollate lyase out of four allantoin-degrading enzymes is present in mammals. *Biochem J*, 1995. **312** (Pt 1): p. 315-8.

15. Manfredi, J.P. and E.W. Holmes: Purine salvage pathways in myocardium. *Annu Rev Physiol*, 1985. **47**: p. 691-705.
16. Berry, C.E. and J.M. Hare: Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol*, 2004. **555** (Pt 3): p. 589-606.
17. Torres, R.J. and J.G. Puig: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency: Lesch-Nyhan syndrome. *Orphanet J Rare Dis*, 2007. **2**: p. 48.
18. Wilson, J.M., et al.: Human adenine phosphoribosyltransferase. Complete amino acid sequence of the erythrocyte enzyme. *J Biol Chem*, 1986. **261**(29): p. 13677-83.
19. Srivastava, S.K. and E. Beutler: Purification and kinetic studies of adenine phosphoribosyltransferase from human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys*, 1971. **142**(2): p. 426-34.
20. Puchulu-Campanella, E., et al.: Identification of the components of a glycolytic enzyme metabolon on the human red blood cell membrane. *J Biol Chem*, 2013. **288**(2): p. 848-58.
21. Wu, F., L.N. Pelster, and S.D. Minter: Krebs cycle metabolon formation: metabolite concentration gradient enhanced compartmentation of sequential enzymes. *Chem Commun (Camb)*, 2015. **51**(7): p. 1244-7.
22. An, S., et al.: Reversible compartmentalization of de novo purine biosynthetic complexes in living cells. *Science*, 2008. **320**(5872): p. 103-6.
23. Zhao, H., et al.: Quantitative analysis of purine nucleotides indicates that purinosomes increase de novo purine biosynthesis. *J Biol Chem*, 2015. **290**(11): p. 6705-13.
24. French, J.B., et al.: Hsp70/Hsp90 chaperone machinery is involved in the assembly of the purinosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(7): p. 2528-33.
25. An, S., et al.: Microtubule-assisted mechanism for functional metabolic macromolecular complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(29): p. 12872-6.
26. French, J.B., et al.: Spatial colocalization and functional link of purinosomes with mitochondria. *Science*, 2016. **351**(6274): p. 733-7.
27. Fu, R., et al.: Clinical severity in Lesch-Nyhan disease: the role of residual enzyme and compensatory pathways. *Mol Genet Metab*, 2015. **114**(1): p. 55-61.
28. Baresova, V., et al.: Mutations of ATIC and ADSL affect purinosome assembly in cultured skin fibroblasts from patients with AICA-ribosiduria and ADSL deficiency. *Hum Mol Genet*, 2012. **21**(7): p. 1534-43.

29. Li, S., et al.: Crystal structure of human phosphoribosylpyrophosphate synthetase 1 reveals a novel allosteric site. *Biochem J*, 2007. **401**(1): p. 39-47.
30. Eriksen, T.A., et al.: Structural basis for the function of *Bacillus subtilis* phosphoribosyl-pyrophosphate synthetase. *Nat Struct Biol*, 2000. **7**(4): p. 303-8.
31. Tang, W., et al.: Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of human phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1 (PRS1). *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2006. **62**(Pt 5): p. 432-4.
32. Zakataeva, N.P., et al.: Wild-type and feedback-resistant phosphoribosyl pyrophosphate synthetases from *Bacillus amyloliquefaciens*: purification, characterization, and application to increase purine nucleoside production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012. **93**(5): p. 2023-33.
33. Chen, P., et al.: Crystal and EM structures of human phosphoribosyl pyrophosphate synthase I (PRS1) provide novel insights into the disease-associated mutations. *PLoS One*, 2015. **10**(3): p. e0120304.
34. de Brouwer, A.P., et al.: PRPS1 mutations: four distinct syndromes and potential treatment. *Am J Hum Genet*, 2010. **86**(4): p. 506-18.
35. Tatibana, M., et al.: Mammalian phosphoribosyl-pyrophosphate synthetase. *Adv Enzyme Regul*, 1995. **35**: p. 229-49.
36. Gallois, R., et al.: Purification and Characterization of Phosphoribosylpyrophosphate Synthetase from Rubber Tree Latex. *Plant Physiol*, 1997. **115**(2): p. 847-852.
37. [cited 19. 7. 2017]; Available from: <https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>.
38. Miller, G.A., Jr., S. Rosenzweig, and R.L. Switzer: Oxygen-18 studies of the mechanism of pyrophosphoryl group transfer catalyzed by phosphoribosylpyrophosphate synthetase. *Arch Biochem Biophys*, 1975. **171**(2): p. 732-6.
39. Ishizuka, T., et al.: Cloning and sequencing of human complementary DNA for the phosphoribosylpyrophosphate synthetase-associated protein 39. *Biochim Biophys Acta*, 1996. **1306**(1): p. 27-30.
40. Katashima, R., et al.: Molecular cloning of a human cDNA for the 41-kDa phosphoribosylpyrophosphate synthetase-associated protein. *Biochim Biophys Acta*, 1998. **1396**(3): p. 245-50.
41. Mittal, R., et al.: Association of PRPS1 Mutations with Disease Phenotypes. *Dis Markers*, 2015. **2015**: p. 127013.
42. Simmonds, H.A., et al.: An inborn error of purine metabolism, deafness and neurodevelopmental abnormality. *Neuropediatrics*, 1985. **16**(2): p. 106-8.

43. Becker, M.A., et al.: Inherited superactivity of phosphoribosylpyrophosphate synthetase: association of uric acid overproduction and sensorineural deafness. *Am J Med*, 1988. **85**(3): p. 383-90.
44. Porrmann, J., et al.: Novel PRPS1 gain-of-function mutation in a patient with congenital hyperuricemia and facial anomalies. *Am J Med Genet A*, 2017.
45. Becker, M.A., et al.: The genetic and functional basis of purine nucleotide feedback-resistant phosphoribosylpyrophosphate synthetase superactivity. *J Clin Invest*, 1995. **96**(5): p. 2133-41.
46. Roessler, B.J., et al.: Identification of distinct PRS1 mutations in two patients with X-linked phosphoribosylpyrophosphate synthetase superactivity. *Adv Exp Med Biol*, 1991. **309B**: p. 125-8.
47. García-Pavía, P., et al.: Phosphoribosylpyrophosphate synthetase overactivity as a cause of uric acid overproduction in a young woman. *Arthritis & Rheumatism*, 2003. **48**(7): p. 2036-2041.
48. Liu, X., et al.: Loss-of-function mutations in the PRPS1 gene cause a type of nonsyndromic X-linked sensorineural deafness, DFN2. *Am J Hum Genet*, 2010. **86**(1): p. 65-71.
49. Kim, J.W. and H.J. Kim: Charcot-Marie-Tooth Neuropathy X Type 5, in *GeneReviews(R)*, R.A. Pagon, et al., Editors. 1993: Seattle (WA).
50. Kim, H.J., et al.: Mutations in PRPS1, which encodes the phosphoribosyl pyrophosphate synthetase enzyme critical for nucleotide biosynthesis, cause hereditary peripheral neuropathy with hearing loss and optic neuropathy (cmtx5). *Am J Hum Genet*, 2007. **81**(3): p. 552-8.
51. de Brouwer, A P M., et al.: Arts Syndrome Is Caused by Loss-of-Function Mutations in PRPS1. *Am J Hum Genet*, 2007. **81**(3): p. 507-18.
52. Robusto, M., et al.: The expanding spectrum of PRPS1-associated phenotypes: three novel mutations segregating with X-linked hearing loss and mild peripheral neuropathy. *Eur J Hum Genet*, 2015. **23**(6): p. 766-73.
53. Park, J., et al.: Exome Sequencing Reveals a Novel PRPS1 Mutation in a Family with CMTX5 without Optic Atrophy. *J Clin Neurol*, 2013. **9**(4): p. 283-8.
54. Synofzik, M., et al.: X-linked Charcot-Marie-Tooth disease, Arts syndrome, and prelingual non-syndromic deafness form a disease continuum: evidence from a family with a novel PRPS1 mutation. *Orphanet J Rare Dis*, 2014. **9**: p. 24.
55. Moran, R., et al.: Phosphoribosylpyrophosphate synthetase superactivity and recurrent infections is caused by a p.Val142Leu mutation in PRS-I. *Am J Med Genet A*, 2012. **158A**(2): p. 455-60.

56. Hunsucker, S.A., B.S. Mitchell, and J. Spychala: The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. *Pharmacol Ther*, 2005. **107**(1): p. 1-30.
57. Wallden, K. and P. Nordlund: Structural basis for the allosteric regulation and substrate recognition of human cytosolic 5'-nucleotidase II. *J Mol Biol*, 2011. **408**(4): p. 684-96.
58. Spychala, J., V. Madrid-Marina, and I.H. Fox: High Km soluble 5'-nucleotidase from human placenta. Properties and allosteric regulation by IMP and ATP. *J Biol Chem*, 1988. **263**(35): p. 18759-65.
59. Pesi, R., et al.: The bifunctional cytosolic 5'-nucleotidase: regulation of the phosphotransferase and nucleotidase activities. *Arch Biochem Biophys*, 1994. **312**(1): p. 75-80.
60. Oka, J., et al.: Molecular cloning of human cytosolic purine 5'-nucleotidase. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994. **205**(1): p. 917-22.
61. Wallden, K., et al.: Crystal structure of human cytosolic 5'-nucleotidase II: insights into allosteric regulation and substrate recognition. *J Biol Chem*, 2007. **282**(24): p. 17828-36.
62. Itoh, R.: Regulation of cytosol 5'-nucleotidase by adenylate energy charge. *Biochim Biophys Acta*, 1981. **659**(1): p. 31-7.
63. Torres, R.J., J.G. Puig, and H.A. Jinnah: Update on the phenotypic spectrum of Lesch-Nyhan disease and its attenuated variants. *Curr Rheumatol Rep*, 2012. **14**(2): p. 189-94.
64. Pesi, R., et al.: Cytosolic 5'-nucleotidase hyperactivity in erythrocytes of Lesch-Nyhan syndrome patients. *Neuroreport*, 2000. **11**(9): p. 1827-31.
65. Tzoneva, G., et al.: Activating mutations in the NT5C2 nucleotidase gene drive chemotherapy resistance in relapsed ALL. *Nat Med*, 2013. **19**(3): p. 368-71.
66. Mullighan, C.G.: Mutant PRPS1: a new therapeutic target in relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med*, 2015. **21**(6): p. 553-4.
67. Koren, G., et al.: Systemic exposure to mercaptopurine as a prognostic factor in acute lymphocytic leukemia in children. *N Engl J Med*, 1990. **323**(1): p. 17-21.
68. Karran, P.: Thiopurines, DNA damage, DNA repair and therapy-related cancer. *Br Med Bull*, 2006. **79-80**: p. 153-70.
69. Hnizda, A., et al.: Oligomeric interface modulation causes misregulation of purine 5 - nucleotidase in relapsed leukemia. *BMC Biol*, 2016. **14**(1): p. 91.
70. *ExPASy Proteomics Server*. 2017 [cited 4. 8. 2017]; Available from: <http://www.expasy.org/tools/protparam.html>.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka